



MiR-199a-5p, un “ fibromiR ” amplificateur de la voie du TGF-beta dans la fibrose pulmonaire idiopathique

Imène Sarah Henaoui

► To cite this version:

Imène Sarah Henaoui. MiR-199a-5p, un “ fibromiR ” amplificateur de la voie du TGF-beta dans la fibrose pulmonaire idiopathique. Sciences agricoles. Université Nice Sophia Antipolis, 2013. Français. NNT : 2013NICE4136 . tel-00931984

HAL Id: tel-00931984

<https://theses.hal.science/tel-00931984>

Submitted on 16 Jan 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE

En vue de l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE NICE SOPHIA-ANTIPOLIS

Ecole doctorale Sciences de la Vie et de la Santé **ED85**

Mention: Sciences, Technologie, Santé

Spécialité: Recherche clinique et thérapeutique

Laboratoire de Physiologie Génomique des Eucaryotes UMR CNRS 7275

MiR-199a-5p, un « fibromiR » amplificateur de la voie du TGF-beta dans la fibrose pulmonaire idiopathique

présentée et soutenue publiquement par
Imène-Sarah henaoui

Le 16 Décembre 2013 à 14h00 devant le jury composé de

Pr Charles-Hugo MARQUETTE
Pr Romano REGAZZI
Pr Bruno CRESTANI
Dr Christelle CAUFFIEZ
Dr Hervé GROUX
Dr Bernard MARI

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Directeur de thèse

RESUME

La Fibrose Pulmonaire idiopathique (FPI) est une maladie fibroproliférative de mauvais pronostic qui représente un problème croissant de santé publique, et pour laquelle aucun traitement efficace n'existe à ce jour. Les mécanismes à l'origine de cette pathologie incurable restent encore largement méconnus et impliquent de nombreux types cellulaires et facteurs de croissance, tel que le TGF- β . Ce dernier conduit notamment à l'activation de fibroblastes pulmonaires en myofibroblastes, organisés en foyers fibroblastiques et responsables d'un dépôt anormal et excessif de matrice extracellulaire. Une des stratégies pour combattre cette maladie dévastatrice est donc de cibler cette population cellulaire très agressive en limitant leur activation et/ou en favorisant leur apoptose. Dans ce contexte, et au vu de l'implication croissante des microARN (miARN) dans de nombreuses pathologies, nous nous sommes intéressés à l'étude de leur implication potentielle dans les processus de fibrose, tout particulièrement dans la FPI.

Afin d'identifier les miARN dont l'expression est dérégulée lors de la fibrogénese, nous avons effectué une analyse par puces à ADN de l'ensemble des miARN dérégulés à partir d'échantillons pulmonaires de deux souches de souris, résistantes ou sensibles à la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine. MiR-199a-5p est apparu comme le meilleur candidat de part sa relevance statistique, son potentiel discriminant de la sensibilité à la fibrose induite par la bléomycine, mais aussi sa surexpression dans deux autres modèles murins de fibrose tissulaire, fibrose rénale et hépatique. Nous avons ensuite validé la surexpression de miR-199a-5p chez les patients atteints de FPI (cohorte de 94 IPF comparé à 83 contrôles) et montré que son expression était localisée principalement dans les foyers de myofibroblastes. J'ai par la suite démontré que l'expression de miR-199a-5p était induite dans des fibroblastes pulmonaires après stimulation par le TGF- β *in vitro*, et que la surexpression ectopique de miR-199a-5p induisait leur différenciation en myofibroblastes. Grâce à une méthodologie combinant des outils de prédiction de cibles de miARN et une approche transcriptomique, j'ai pu identifier la Cavéoline-1 (CAV-1) comme une des cibles de miR-199a-5p. La CAV-1 est notamment impliquée dans la dégradation du récepteur du TGF- β et la diminution de son expression joue un rôle important dans les processus fibrotiques. Ainsi, la surexpression de miR-199a-5p est responsable de l'inhibition d'expression de CAV-1, constituant une boucle de rétrocontrôle positif responsable de l'exacerbation de la voie du TGF- β dans les fibroblastes pulmonaires. De manière intéressante, l'inhibition de miR-199a-5p *in vitro* inhibe la différenciation, la prolifération et la migration des fibroblastes induites par le TGF- β .

Enfin, des résultats récents obtenus *in vivo* dans le modèle de fibrose induite par la bléomycine indiquent également qu'un inhibiteur dirigé contre ce miARN semble diminuer les marqueurs de fibrose. Ces résultats encourageants nécessitent d'être répliqués à plus grande échelle, mais permettent d'envisager le développement de nouvelles approches thérapeutiques basées sur l'inhibition des « fibromiRs », particulièrement miR-199a-5p dans le traitement de la FPI et d'autres maladies fibroprolifératives.

MOTS CLES: microARN, fibrose pulmonaire idiopathique, TGF- β , cavéoline-1, myofibroblastes.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES FIGURES	7
TABLE DES TABLEAUX	8
LISTE DES ABREVIATIONS	8
INTRODUCTION	10
Chapitre I : La Fibrose Pulmonaire Idiopathique	11
I) Les maladies fibroprolifératives	11
II) La fibrose pulmonaire idiopathique (FPI)	11
1) Généralités sur la FPI	11
2) La découverte de la FPI	12
3) Epidémiologie	12
4) Diagnostic	13
5) Etiologie	13
(a) Les facteurs environnementaux	13
(b) Facteurs génétiques	14
(c) Le reflux gastro-oesophagien (RGO)	15
(d) Les infections virales	15
III) La FPI, une maladie inflammatoire ou bien épithéliale ?	15
IV) La progression de la fibrose : un phénomène de cicatrisation incontrôlée	17
1) La phase inflammatoire	18
(a) La phase vasculaire	18
(b) La phase cellulaire	19
2) La phase de prolifération et de migration	21
3) Lien entre angiogénèse et fibrose	22
4) La phase de remodelage	24
V) Les myofibroblastes	24
1) Origine des Myofibroblastes	25
(a) Les fibroblastes résidents	25
(b) Les fibrocytes	26
(c) Transition épithélio-mésenchymateuse	26
(d) Transition endothélio-mésenchymateuse	27
VI) Le facteur de croissance TGF-β	27
1) Synthèse et maturation du TGF	28
2) La transduction du signal	28
VII) Régulation de la signalisation du TGF-β par la Cavéoline-1	30
1) Présentation des cavéoles	30
2) Les Cavéolines	30
3) La cavéoline-1 : une protéine de structure des cavéoles	30
4) Synthèse et dynamique intra-cellulaire	31
5) Cavéoline, TGF- β et fibrose pulmonaire	32
VIII) Traitement	33
1) Traitements symptomatiques	33
2) Le traitement des complications	34
(a) Les exacerbations aiguës	34
(b) Les infections virales	35
(c) Le reflux gastro-œsophagien (RGO)	35
(d) L'hypertension artérielle pulmonaire	35
3) Traitement antifibrotique, la Pirfenidone	35
4) N-acetylcysteine	36
5) La transplantation pulmonaire	36
6) De nouvelles approches thérapeutiques	37
(a) Les inhibiteurs des récepteurs tyrosines kinase (RTKs)	37

(b)	Anti IL-13	37
(c)	Anti-CCL2	37
(d)	Anti-TGF- β	38
(e)	Anti-Lysyl oxydase (LOXL2)	38
(f)	Les microARN	38
Chapitre II: Les miARN		40
I)	La découverte des miARN	40
II)	La découverte de l'interférence ARN (i-ARN)	41
III)	Présentation générale des miARN	42
1)	Organisation génomique des miRNA	43
2)	Biogenèse et maturation des miARN	43
(a)	Voie canonique de maturation des miARN	43
(b)	Les voies alternatives de maturation des miARN	44
IV)	Mécanismes d'action des miARN	45
1)	Le complexe RISC (RNA induced Silencing complex)	45
2)	Les mécanismes de répression d'expression des cibles de miARN	46
(a)	L'inhibition de la traduction	46
(b)	Déstabilisation de l'ARNm cible	47
(c)	Séquestration dans les p-Bodies	48
V)	Les méthodes d'identification de cibles de miARN	48
1)	Les règles d'appariement du miARN avec ses cibles	48
2)	Des cas particulier d'appariements	49
3)	Les principales méthodes d'identification de cibles : approches <i>in silico</i> et expérimentales	50
4)	Quelles conséquences sur le nombre de cibles ?	52
VI)	Fonctions biologiques des miARN : des régulateurs fins des processus biologiques	52
1)	Les boucles d'anticipation	53
2)	Les boucles de rétroaction négative	53
3)	Les boucles de rétrocontrôle positif	54
VII)	MiARN et processus fibrotique	54
1)	Généralités	54
2)	TGF- β et miARN : des liens complexes	55
3)	La régulation transcriptionnelle des miARN par les protéines Smad	55
(a)	La répression directe de la transcription	55
(b)	Activation directe de la transcription par la voie classique	55
(c)	Contrôle indirect de la transcription	56
(d)	Régulation épigénétique des miARN	56
(e)	Régulation post-transcriptionnelle	57
VIII)	Une régulation réciproque: contrôle de la voie canonique TGF-β par les miARN	58
1)	Contrôle de l'expression des récepteurs au TGF- β	58
2)	Contrôle direct de l'expression des protéines Smad	58
3)	Contrôle des gènes induit par la voie du TGF- β	59
4)	Contrôle de l'expression des miARN par les voies alternatives du TGF- β	59
IX)	Les principaux miARN dérégulés dans les processus fibrotiques	59
1)	Le rôle de miR-133 et miR-30 dans la régulation de l'expression de TGF β /CTGF	59
2)	Le rôle de Let-7 dans l'EMT	60
3)	Rôle de miR-155 dans les relations épithélio-mésenchymateuses	60
4)	Le rôle de miR-29 et miR-449 dans la régulation de l'expression de la matrice extracellulaire	61
5)	Le rôle profibrotique de miR-21 et miR-23a	61
X)	MiARN et thérapies	63
1)	La stratégie thérapeutique du remplacement du miARN	63
2)	La stratégie thérapeutique d'inhibition du miARN	64
3)	La stratégie thérapeutique de protection de la cible du miARN	65
XI)	Conclusion	65

PRESENTATION ET OBJECTIFS DU PROJET	66
<i>Présentation de la famille miR-199</i>	67
PRINCIPAUX RESULTATS PUBLIES	68
I) Article	69
<i>MiR-199a-5p Is Upregulated during Fibrogenic Response to Tissue Injury and Mediates TGFbeta-Induced Lung Fibroblast Activation by Targeting Caveolin-1</i>	69
II) Revue	70
RESULTATS NON PUBLIES	71
I) Potentiel thérapeutique du LNA-anti-miR-199a-5p dans le modèle de fibrose pulmonaire induite par bléomycine	71
1) Mise au point du modèle expérimental <i>in vivo</i>	71
(a) L'instillation intratrachéale de bléomycine induit des lésions pulmonaires comparables à celles d'une FPI	71
(b) La réduction de la dose de bléomycine ne permet pas de réduire la mortalité précoce et semble induire une fibrose moins efficacement. L'administration du LNA par voie intra-péritonéale est bien tolérée.	71
(c) Réplication des résultats	72
2) Intensification du traitement par le LNA-miR-199a-5p	73
MATERIELS ET METHODES	74
1) Inhibiteurs de miARN	74
2) Expérimentation <i>In vivo</i>	74
3) Analyse protéique	75
(a) Les anticorps primaires:	75
4) Analyse des ARN	75
5) Northern Blot	76
6) Calculs et analyse statistique	76
II) ANNEXES	77
III) DISCUSSION	78
REFERENCES	88
RESUME	107

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : L'aspect radiologique et histopathologique d'une Pneumopathie Interstitielle Usuelle (UIP)	14
Figure 2 : Recrutement de cellules inflammatoires vers les sites des lésions tissulaires	20
Figure 3 : Les Sous-ensembles de cellules spécialisées ; lymphocytes T auxiliaires et les macrophages jouent des rôles distincts dans la fibrose pulmonaire	21
Figure 4 : Médiateurs pro-inflammatoires et pro-fibrotiques dans l'initiation et le maintien de la fibrose	22
Figure 5 : L'activation des fibroblastes	25
Figure 6 : Origines des myofibroblastes	26
Figure 7 : Synthèse et maturation du TGF- β	29
Figure 8 : La voie canonique du TGF- β /Smad ainsi que ses inhibiteurs	30
Figure 9 : Les protéines Smads et leurs éléments structurels	31
Figure 10 : Cavéoline et signalisation du TGF- β	33
Figure 11 : Profils évolutifs au cours de la FPI	34
Figure 12 : Vue globale des différentes approches thérapeutiques dans la FPI	35
Figure 13 : Les phénotypes mutants pour lin-4 et lin-14 chez <i>C.elegans</i>	40
Figure 14 : Les miARN lin-4 et let-7.	41
Figure 15 : Les différentes classes d'ARN	42
Figure 16 : La structure de certains pri-miARN humains	43
Figure 17 : Biogenèse des miARN	44
Figure 18 : Les différents acteurs impliqués dans les processus de maturation des miARN	45
Figure 19 : Protéines impliquées dans la répression de gènes par les miARN	46
Figure 20 : Les différents types d'appariements	50
Figure 21 : Exemples de boucles de régulations induites par les miARN	54
Figure 22 : Rôle des protéines Smads dans la régulation de la transcription et de la maturation des miARN	56
Figure 23 : Exemples d'outils thérapeutiques pour le contrôle de la régulation de gènes par les miARN	65
Figure 24 : Les différentes modifications chimiques des inhibiteurs de miARN comme outils thérapeutiques	66
Figure 25: Localisation génomique de miR-199a	68
Figure 26: Aspect histologique des lésions pulmonaires induites par la bléomycine	72
Figure 27: Mise au point de l'induction de la fibrose par instillation intra-trachéale de bléomycine	73
Figure 28: Réplication de la première expérience	74
Figure 29: Intensification du traitement par le LNA-anti-miR-199a-5p	75
Figure 30: Analyse de l'activation du promoteur du gène DNM3OS par le TGF- β	78
Figure 31: L'inhibition de MiR-199a-5p augmente la dégradation du récepteur au TGF- β par CAV-1	80
Figure 32: Modèle représentant l'activation de l'expression du cluster miR-199a~214 en réponse à l'hypoxie	82

TABLE DES TABLEAUX

<i>Tableau 1 : Les principales maladies fibroprolifératives chez l'homme</i>	12
<i>Tableau 2 : Classification clinique et histopathologique des pneumopathies interstitielles idiopathiques</i>	13
<i>Tableau 3: Potentiel thérapeutique de la modulation des FibromiR</i>	64
<i>Tableau 4 : régulation et fonction de MiR-199a dans les cancers humains</i>	81

LISTE DES ABREVIATIONS

3'UTR (Three Prime Untranslated Region)	Ig (Immunoglobulines)
AAV (Adeno-Associated Viruses)	IGF-L (insuline like growth factor)
ADN (Acide Désoxyribonucléique)	I-SMAD (Inhibitor SMAD)
AEC (Alveolar Epithelial Cells)	JNK (c-Jun NH2-terminal Kinase)
Ago (protéine Argonaute)	KGF (keratinocyte Growth Factor)
ARN (Acide Ribonucléique)	LAP (Latency Associated Peptide)
c.elegans (Caenorhabditis elegans)	LNA (Locked Nucleic Acids)
CAV-1 (Cavéoline-1)	MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1)
CBP (Cap Binding protein)	MEC (matrice extracellulaire)
CD1 (cluster of differentiation 1)	MHV-68 (Murine gamma-HerpesVirus)
CMV (cytomégalovirus)	miARN (microARN)
Co-SMAD (common-mediator Smad	MMP (Matrix MetalloProteinases)
“SMAD4”)	MRE (microRNA Response Element)
CTGF (Connective Tissue Growth Factor)	MUC5B (Mucine 5b)
CXC (chimiokines)	NAC (N-acetylcysteine)
DNM (dynamine)	NO (nitric oxyde)
EBV (Ebstein-Barr Virus)	p38 MAPK (Extracellular Regulated Kinase)
EGF (Epidermal Growth Factor)	PABP (poly A binding protein)
eIF4F (eukaryotic Initiation Factors 4F)	P-Bodies (Processing-Bodies)
ELMOD2 (ELMO/CED-12 domain containing	PCR (Polymerase Chain Reaction)
2)	PDGF (Platelet-Derived Growth Factor)
EMT (Epithelial to Mesenchymal Transition)	PGI2 (prostaglandine I2)
FGF (Fibroblast Growth Factor)	PI3K (Phosphoinositide 3 Kinase)
FPI (Fibrose pulmonaire idiopathique)	piARN (piwi interacting RNA)
GDF (Growth and Differentiation Factors)	Pol-II (ARN polymérase II)
HLA (Human Leucocyte Antigen)	PTGS (Post-Transcriptional Gene Silencing)
HTP (Hypertension pulmonaire)	RBP (RNA binding Proteins)
i-ARN (l'interférence ARN)	RGO (Reflux Gastro-Oesophagien)
IFN γ R (Interferon-gamma receptor)	RISC (RNA induced Silencing complex)

R-SMAD (receptor-regulated SMADs)
RTKs (récepteurs tyrosines kinase)
SAOS (Syndrome D'apnée Obstructif du
Sommeil)
SBE (Smad Binding Element)
SFTP (Surfactant protein)
siARN (short interfering RNAs)
TDM (Tomodensitométrie)
TERC (Telomerase RNA Component)
TERT (Telomerase Reverse Transcriptase)
TGF- β (Transforming Growth Factor-beta)
T β R (Transforming Growth Factor-beta
Receptor)
TH2 (T-helper Type 2 immunity)
tPA (tissue Plasminogen Activator)
TSB (Target Site Bloker)
TSP-1 (Thrombospondine-1)
UIP (Usual Interstitial Pneumonia)
UIP(Usual interstitial pneumonia)
uPA (urokinase Plasminogen Activator)
VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)
 α -SMA (α -smooth muscle actin)

INTRODUCTION

« On se lasse de tout sauf de comprendre. » - Virgile

Tableau 1 : Les principales maladies fibroprolifératives chez l'homme (Adapté de Wynn, 2004)

Fibrose pulmonaire diffuses (FPD)	Cette terminologie regroupe un grand nombre de désordres pulmonaires différents, ayant tous pour conséquence une inflammation et une fibrose pulmonaire. On note plus de 150 causes de FPD, comme la Sarcoïdose (maladie inflammatoire systémique), toxicité médicamenteuse, exposition à l'amiante, certaines infections (tuberculose), la polyarthrite rhumatoïde ou la sclérose systémique. La FPI, d'étiologie inconnue représente une des FPD les plus fréquentes.
Cirrhose hépatique fibrosante	La fibrose hépatique, dont la cirrhose est le stade le plus avancé, a comme la FPD de très nombreuses étiologies. Néanmoins, l'hépatite virale et l'alcoolisme chronique représente la cause de plus de 90% des cirrhoses dans le monde.
Fibrose rénale	Les causes de la fibrose rénale et de l'insuffisance rénale sont multiples et regroupent des atteintes mécaniques, immunologiques, infectieuses, toxiques ou héréditaires.
Fibrose cardiaque	La fibrose cardiaque joue un rôle majeur dans l'insuffisance cardiaque, car le tissu fibreux altère la capacité du myocarde à jouer son rôle de pompe.
Désordres fibroprolifératifs	<ul style="list-style-type: none"> • Sclérodermie locale ou systémique • Cicatrices hypertrophiques et chéloïdes • Atherosclérose
Fibrose rétinienne	La dégénérescence maculaire et les rétinopathies peuvent avoir comme conséquence une fibrose induisant une perte de la vision.
Cicatrisation à la suite de trauma	<ul style="list-style-type: none"> • Complications chirurgicales • Fibrose induite par la chimiothérapie • Fibrose induite par les radiations • Brûlures

Chapitre I : La Fibrose Pulmonaire Idiopathique

I) Les maladies fibroprolifératives

La fibrose est définie comme une augmentation des constituants fibrillaires de la matrice extracellulaire (MEC) dans un tissu ou un organe, suite à un phénomène de **cicatrisation non contrôlée** en réponse à des agressions tissulaires répétées. Ces pathologies peuvent toucher différents organes tel que les poumons, le foie, les reins, le cœur ou bien la peau, aboutissant à la perte de fonction de l'organe atteint (Antic, Distler et al. 2013; Ghosh, Murphy et al. 2013; Schuppan and Kim 2013). Différentes causes peuvent être à l'origine des dommages causés au niveau des différents tissus : lésions chroniques de type chimique, mécanique, infectieux ou auto immunitaire.

Les pathologies fibroprolifératives, comprenant essentiellement la fibrose pulmonaire, la sclérose systémique, la cirrhose du foie, les maladies cardiovasculaires, les maladies rénales chroniques ainsi que la dégénérescence maculaire (**Tableau 1**), représentent un problème majeur de santé publique et leur prévalence est en constante augmentation dans les pays industrialisés. On estime ainsi aux Etats-Unis que 45% des décès surviennent suite à des désordres à composante fibrotique (Wynn 2007). Le remodelage des tissus fibreux peut également influencer les processus métastatiques dans les cancers épithéliaux et accélérer le rejet de greffe chronique chez les patients greffés. Néanmoins, en dépit de son énorme impact sur la santé humaine, il n'existe actuellement aucun traitement approuvé qui cible directement la fibrose.

II) La fibrose pulmonaire idiopathique (FPI)

L'étiologie des maladies fibrotiques pulmonaires est variée, avec une source de déclencheurs distincts comme les infections, les produits chimiques, les radiations et les particules de l'environnement. Cependant, la (les) cause(s) de l'une des pathologies fibrotiques les plus courantes (la FPI) reste(nt) à ce jour peu voire non identifiée(s), d'où le terme **idiopathique** attribué à cette pathologie. La fibrose pulmonaire et le remodelage architectural des tissus vont perturber gravement les fonctions pulmonaires, aboutissant à une défaillance pulmonaire mortelle.

1) Généralités sur la FPI

La FPI est la forme la plus fréquente constituant ~ 60 % des pneumopathies interstitielles idiopathiques (Riha, Duhig et al. 2002; Hoo and Whyte 2012). Bien que ce soit une maladie relativement rare, son incidence est considérée comme étant en progression (Gribbin,

Tableau 2 : Classification clinique et histopathologique des pneumopathies interstitielles idiopathiques selon le consensus international rédigé par l’American Thoracic Society(ATS) et l’European Respiratory Society (ERS) en 2002. (Adapté de Nicholson, 2002 et Myers, 2009)

Aspect histopathologique	Diagnostic clinique
Pneumopathie interstitielle commune (Usual interstitial pneumonia, UIP)	Fibrose pulmonaire idiopathique (FPI) / comprenant deux formes cliniques sporadique et familiale
Pneumopathie interstitielle non spécifique (Nonspecific interstitial pneumonia, NSIP)	Pneumopathie interstitielle non spécifiques
Pneumopathie organisée (Organizing pneumonia,OP)	Pneumopathie organisée cryptogénique
Domage alvéolaire diffus (Diffuse alveolar damage, DAD)	Pneumopathie interstitielle aigue
Pneumopathie interstitielle desquamative (Desquamative interstitial pneumonia,DIP)	Pneumopathie interstitielle desquamative
Bronchiolite respiratoire (Respiratory bronchiolitis,RB)	Bronchiolite respiratoire associée aux Pneumopathie interstitielles (Respiratory bronchiolitis-associated interstitial lung disease,RBILD)
Pneumopathie interstitielle lymphocytaire (Lymphocytic interstitial pneumonia,LIP)	Pneumopathie interstitielle lymphocytaire

Hubbard et al. 2006; Navaratnam, Fleming et al. 2011). L'évolution de la pathologie est généralement lente mais elle est fréquemment associée à des phases d'exacerbation, aboutissant inévitablement à l'insuffisance respiratoire terminale avec une médiane de survie de 2-5 ans. Il n'existe à l'heure actuelle aucun traitement permettant de diminuer la mortalité en dehors de la transplantation pulmonaire (Wells 2013). Les traitements « conventionnels » utilisés se sont révélés inefficaces voire délétères (Raghu and Thickett 2013). La FPI est donc un problème de santé publique majeur, qui nécessite de développer de nouvelles approches thérapeutiques originales.

2) La découverte de la FPI

Hamman et Rich sont généralement considérés comme étant les premiers à avoir décrit les quatre premiers cas de fibrose pulmonaire idiopathique au sein de l'hôpital Johns Hopkins survenues entre 1931 et 1935 (Hamman and Rich 1935). Cependant, les premières descriptions superposables à des formes de fibrose pulmonaire idiopathique ont été publiées en 1872 par Von Buhl. Il décrit un phénotype histologique comprenant des foyers fibroblastiques et un dépôt excessif de matrice extracellulaire, et présente la maladie comme étant une pneumopathie interstitielle chronique en considérant que la cause était probablement infectieuse due à la tuberculose ou la syphilis. En 1898, Rindfleisch effectue une étude nécropsique sur un patient d'une quarantaine d'années qui souffrait de toux et d'insuffisance respiratoire, et son étude histologique, revisitée aujourd'hui coïncide avec une UIP (pneumopathie interstitielle commune). La première forme familiale de FPI détectée chez deux jeunes jumelles, fût décrite par Sandoz en 1987 (Homolka 1987). Les publications se sont ensuite multipliées dans les années cinquante, pour parvenir aux premières classifications des pneumonies interstitielles idiopathiques en 1975 par Liebow et Carrington. Un consensus pour la classification de ces pneumopathies a été proposé par l'ATS/ERS en 2002 puis actualisé en 2013 (**Tableau 2**) (Rubin 1955; Scadding 1960; Nicholson 2002; Travis 2013).

3) Épidémiologie

La FPI affecte 5 millions de personnes dans le monde entier, avec une tendance à la hausse depuis ces 10 dernières années (Gribbin, Hubbard et al. 2006). Son incidence est d'environ 10,7 cas pour les hommes, et 7,4 cas pour les femmes pour 100 000 habitants, avec un âge moyen de 65 ans et une légère prédominance masculine. Sa prévalence est respectivement de 20,2 et 13,2 cas pour les hommes et les femmes pour 100 000 habitants (Coultas, Zumwalt et al. 1994; Hansell, Hollowell et al. 1999).

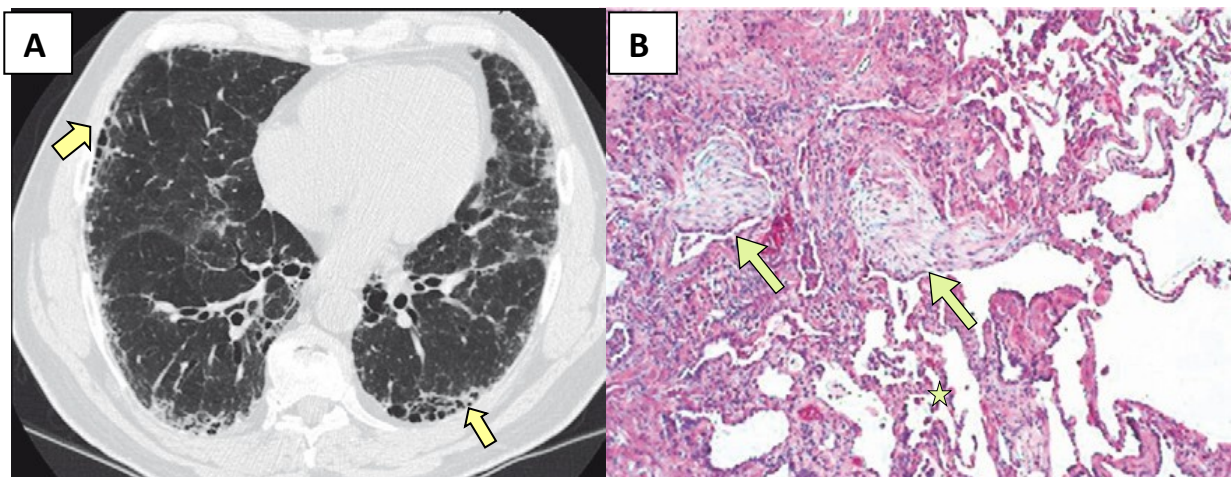


Figure 1 : L'aspect radiologique et histopathologique d'une Pneumopathie Interstitielle Usuelle (UIP)

(A) Tomodensitométrie à haute résolution des poumons d'un patient atteint de fibrose pulmonaire idiopathique. On observe en périphérie les lésions en « rayons de miel » (flèches) caractéristiques de la maladie. (B) Aspect histopathologique d'une (UIP) montrant une distribution hétérogène des lésions avec dépôt de collagène (flèches), et des zones relativement normales (astérisque) (D'après King, 2011)

4) Diagnostic

Le caractère histopathologique de la FPI est celui d'une fibrose interstitielle hétérogène mutilante de l'interstitium pulmonaire comportant des foyers de prolifération fibroblastiques et de myofibroblastes entre l'endothélium vasculaire et l'épithélium alvéolaire, ce qui va perturber l'architecture du poumon, donnant ainsi des lésions en « rayon de miel » et de rares lésions inflammatoires (Qunn, Takemura et al. 2002) (**Figure 1-A**). Le diagnostic ne peut être posé qu'après avoir exclu d'autres causes de fibrose pulmonaire. Il se fonde sur une approche pluridisciplinaire intégrant l'évaluation clinique, les données d'imagerie tomodensitométrique thoracique, et l'aspect histopathologique d'une (UIP) à la biopsie pulmonaire chirurgicale lorsqu'elle est indiquée (**Figure1-B**) (Wells 2013).

Les patients atteints de FPI se plaignent d'essoufflement (dyspnée), mais aussi de toux sèche. La dyspnée est l'expression d'une insuffisance respiratoire chronique de mécanisme mixte : la perte de l'élasticité pulmonaire est responsable d'un trouble ventilatoire (syndrome restrictif) auquel s'associe un effondrement des capacités de diffusion de la membrane alvéolocapillaire. Le mécanisme de la toux reste partiellement inexpliqué. Elle serait associée à une hypersensibilité des fibres C amyéliniques bronchiques ainsi qu'à une perméabilité épithéliale anormale exposant les récepteurs à la substance P (De Vries, Kessels et al. 2001; Selman, King et al. 2001; De Vries, Kessels et al. 2001; Selman, King et al. 2001; Hope-Gill et al. 2003). Un autre élément clinique caractéristique mais non spécifique, est la survenue d'un hippocratisme digital ou ostéoarthropathie hypertrophique secondaire dont le mécanisme est inconnu.

5) Etiologie

Bien que la FPI soit d'origine inconnue, plusieurs associations épidémiologiques ont été identifiées, et sont citées ci-dessous. Ils comprennent des facteurs environnementaux, des causes génétiques, physiopathologiques (reflux gastro-œsophagien; RGO) et infectieuses.

(a) Les facteurs environnementaux

Les facteurs environnementaux les plus décrits sont l'exposition aux poussières de bois et de métaux ainsi que le tabagisme (Raghu, Collard et al. 2011). Selon des études épidémiologiques, plus de 70% des patients atteints de FPI sont des fumeurs ou possèdent des antécédents tabagiques (Steele, Speer et al. 2005; Taskar and Coultas 2006). En effet, le tabagisme pourrait d'une part augmenter et accumuler du stress oxydatif, et d'autre part être responsable du raccourcissement des télomères, aggravant ainsi la maladie (prière de se référer au chapitre suivant) (Alder, Chen et al. 2008; Babizhayev, Savel'yeva et al. 2011).

(b) Facteurs génétiques

Les études de liaison génétique dans les formes familiales ou « génome entier » dans les formes sporadiques de FPI mettent en évidence certains polymorphismes ou mutations favorisant l'apparition de la maladie. Toutefois, il n'existe pas de facteurs génétiques systématiquement associés à la forme sporadique (Grutters and du Bois 2005). Les polymorphismes associés à une forte susceptibilité à la FPI sont nombreux. On retrouve notamment des mutations au niveau du promoteur du gène de la mucine 5B (MUC5B), qui joue un rôle protecteur dans les cellules épithéliales bronchiques et dont la diminution de l'expression a été associée à plusieurs maladies respiratoires chroniques, suggérant un rôle dans la pathogénèse de la FPI. La fréquence de ce polymorphisme est de plus de 34% chez les patients atteints de FPI familiale (Seibold, Wise et al. 2011). D'autres études ont rapporté l'influence d'autres gènes comme ELMOD2 (ELMO/CED-12 domain containing 2), qui joue probablement un rôle protecteur contre les infections virales, ou encore des anomalies du système HLA (Human leucocyte antigen) (Fulmer, Sposovska et al. 1978; Zhang, Xu et al. 2012). De manière intéressante, les patients porteurs d'un polymorphisme dans la séquence codante du TGF- β 1 (Transforming Growth Factor- β 1) (Leucine \rightarrow Proline : T869C) seraient également plus à risque de développer une FPI. Ce facteur, qui joue un rôle central dans la pathogénèse de la fibrose, subirait un changement de structure au niveau de son hélice alpha, favorisant ainsi son transport à travers le réticulum endoplasmique, ce qui aggraverait la sévérité et la progression de la maladie (Blobe, Schiemann et al. 2000; Son, Kim et al. 2013).

Les cas de FPI familiale sont le plus souvent associés à une transmission autosomique dominante (Nicholson, Colby et al. 2000; Selman, Thannickal et al. 2004; Steele and Brown 2007). Les principales mutations qui ont été associées à la forme familiale, concernent la télomérase (TERT/TERC ; telomerase reverse transcriptase/telomerase RNA component). Ces mutations expliquent la rapidité de raccourcissement des télomères chez les patients atteints de FPI (Tsang, Wyatt et al. 2012), qui est beaucoup plus importante dans la forme familiale comparé à la sporadique (Garcia 2011). D'autre part, on retrouve aussi des altérations des protéines associées au surfactant, notamment SFTPA2 (surfactant protein A2), ou bien SFTPC (surfactant protein C). Ces protéines sont sécrétées exclusivement par les pneumocytes de type II sous forme d'un pro-peptide qui nécessite l'intégrité de la partie C-terminale pour son étape de transport vers le réticulum endoplasmique afin de subir ensuite plusieurs clivages avant la sécrétion du peptide mature. Le polymorphisme constaté au niveau C-terminal engendre ainsi une accumulation des complexes pro-peptidiques dans le réticulum endoplasmique, et par conséquent augmente le stress du réticulum endoplasmique (Mulugeta,

Nguyen et al. 2005) pouvant ainsi causer des dommages au niveau de l'épithélium respiratoire (Kropski, Lawson et al. 2013).

(c) Le reflux gastro-oesophagien (RGO)

Bien que l'association entre le potentiel pathogène des microaspirations chroniques et la FPI reste incertaine, plusieurs études soutiennent le fait que le RGO pourrait être associé à la FPI en induisant une agression épithéliale répétée (Bandeira, Rubin et al. 2009; Lee, Collard et al. 2010). Toutefois, le RGO est fréquent dans la population générale et pourrait donc être un événement secondaire chez les patients atteints de FPI en raison des effets mécaniques due à l'augmentation de la pression pleurale négative induites par la fibrose, ce qui pourrait favoriser le reflux du contenu gastrique dans l'œsophage (Raghu, Yang et al. 2006). D'autres études sont nécessaires pour évaluer l'effet d'un traitement contre le RGO sur la progression de la FPI.

(d) Les infections virales

Différentes études s'appuyant sur des résultats de Yi-Wei Tang suggèrent un lien entre la FPI et l'infection chronique par le virus Ebstein-Barr (EBV) ou d'autres virus de la famille des Herpès Virus (Tang, Johnson et al. 2003). D'une manière intéressante, des souris déficientes pour CD1 (cluster of differentiation 1; permettant de présenter les antigènes lipidiques étrangers) ou bien IFN γ R (Interferon-gamma receptor; important pour la lutte contre l'infection virale), et infectées avec le gamma-herpesvirus murin (MHV-68) développent une fibrose pulmonaire (Mora, Torres-Gonzalez et al. 2006; Calabrese, Kipar et al. 2013). Ces études montrent que l'infection virale pourrait contribuer à la pathogénèse de la FPI par différents processus, proposant ainsi des essais thérapeutiques utilisant des molécules antivirales (Mora, Torres-Gonzalez et al. 2007).

III) La FPI, une maladie inflammatoire ou bien épithéliale ?

La pathogénèse de la FPI reste énigmatique. Les changements phénotypiques au niveau des cellules épithéliales alvéolaires représentent les signes précurseurs, ce qui suggère que les agressions des cellules épithéliales alvéolaires et les phénomènes d'apoptose sont les mécanismes clefs enclenchant le processus de la pathogénèse de la FPI (Kasper and Haroske 1996; Katzenstein and Myers 1998). Depuis les années 80, beaucoup de progrès ont été réalisés sur la compréhension de sa pathogénèse. Ces études ont montré qu'il y avait des anomalies au niveau de la membrane basale de l'endothélium capillaire, qui se caractérisent par un épaississement ou dédoublement de la membrane basale, aggravée par une forte perte

de pneumocytes alvéolaires de type I, accompagnée de gonflements cytoplasmiques qui manifestent une dégénérescence du tissu (Corrin, Dewar et al. 1985).

Etant donné que l'inflammation joue un rôle important dans la plupart des maladies interstitielles pulmonaires, une première théorie concernant la pathogenèse de la FPI a émergé, suggérant **un stimulus inflammatoire récurrent** induisant une immunopathologie et destruction cellulaire qui s'accompagne d'une propagation de réponses de cicatrisation (Crystal, Bitterman et al. 1984; Crystal, Bitterman et al. 2002; Strieter 2002). Actuellement, l'argument central qui va à l'encontre de la première théorie repose sur l'inefficacité des traitements anti-inflammatoires.

Une seconde théorie a alors été proposée et suggère que les mécanismes pathogéniques ne proviennent pas (ou peu) de l'inflammation mais plutôt d'**une réponse de cicatrisation incontrôlée** (Gauldie 2002; Gauldie, Bonniaud et al. 2007). A la suite d'une lésion, le tissu engage un processus de réparation finement régulé, aboutissant à la formation d'un tissu cicatriciel minime et permettant le maintien structural et fonctionnel du tissu. Dans un processus pathologique tel que la fibrogénèse, le processus de cicatrisation échappe à tout contrôle, malgré la résolution du stress initial et l'absence d'inflammation. Ce phénomène de cicatrisation amplifiée engendre une accumulation de Matrice extracellulaire (MEC), ce qui confère une structure fibreuse, une perte de l'architecture tissulaire et se termine par une perte de la fonction des poumons. Cette théorie ne prend pas en compte cependant la composante inflammatoire sachant que toute blessure ou agression est toujours suivie par une réponse inflammatoire qui déclenche sa réparation.

En 2002, une étude de Zuo *et al.* (Zuo, Kaminski et al. 2002) suggère que la pathogenèse de la FPI est bien plus complexe. En réalisant une étude comparative de l'expression des gènes impliqués dans la FPI chez l'homme et la souris, ils découvrent en effet quatre grands groupes de gènes dérégulés. Le premier groupe inclue des gènes impliqués dans la contraction cellulaire codant pour les protéines de muscle lisse, ainsi qu'une forte expression de l'actine, myosine, et tropomyosine. Un deuxième groupe de gènes impliqués sont associés à signalisation cellulaire (cell adhesion kinase β), et au remodelage de la MEC, avec une induction de composants de la MEC (collagènes de type I, et III, fibronectine, et filamine) mais aussi une forte augmentation de gènes impliqués dans sa dégradation tels que les Métalloprotéases de la Matrice Extracellulaire (MMPs), MMP-1, MMP-2, MMP7 et MMP-9. De manière inattendue, un troisième ensemble de gènes correspond à une induction de cytokines pro-inflammatoires, chimiokines, et anti-oxidants (Zuo, Kaminski et al. 2002). Le quatrième groupe révèle enfin la présence de gènes précurseurs de protéines amyloïdes, et

d'immunoglobulines (Ig), ce qui suggère une réponse immune à une agression associée à l'activation des lymphocytes B et production d'immunoglobulines. Ces deux derniers ensembles de gènes font évoquer une pneumopathie inflammatoire chronique plutôt qu'une UIP. Il est important de noter que cette étude date de 2002, donc avant le consensus sur le diagnostic de la FPI. On ne peut donc exclure qu'elle incluait des pneumopathies interstitielles chroniques fibrosantes autres que des UIP (des pneumopathies interstitielles non spécifiques fibrosantes par exemple).

Une autre étude de Hunninghake *et al* en 2003 (Hunninghake, Lynch et al. 2003) est en faveur de cette hypothèse. Le but de l'étude était d'identifier les caractéristiques cliniques et radiologiques associées à la pathologie et au diagnostic de la PIU en utilisant la tomodensitométrie à haute résolution. Il apparaît que 55% des patients avec un diagnostic de FPI montrent une adénopathie médiastinale significative. Ainsi, en prenant en compte ces deux études, il ressort qu'une réaction immunitaire lymphoproliférative avec production d'immunoglobulines est détectable dans la majorité des patients, ce qui va à l'encontre de la deuxième théorie non inflammatoire.

Une troisième théorie a pu alors unifier les deux précédentes. On pense aujourd'hui que la FPI résulte **d'agressions épithéliales répétées d'origines inconnues sur un terrain vulnérable, s'accompagnant de réponses inflammatoires activant le système immunitaire**. Selon cette hypothèse, les agressions épithéliales récurrentes et/ou les antigènes induisent un déséquilibre qui favorise la réponse TH2 (T-helper Type 2 immunity), ce qui engendre un endommagement de l'épithélium, de l'endothélium et de la membrane basale avec perte des alvéoles qui ne sont plus en mesure de réendothélialiser/répithélialiser la membrane basale. En réponse à ces agressions, il se produit une infiltration des macrophages, fibroblastes, et d'autres cellules de type inflammatoire avec la formation de foyers fibroblastiques comportant des fibroblastes/myofibroblastes responsables de la production de MEC comme le collagène de type I et la fibronectine (Corrin, Dewar et al. 1985; Basset, Ferrans et al. 1986). La formation de tissu cicatriciel provoque alors une perte de l'architecture tissulaire irréversible, avec apparition de structures en rayon de miel, et une inflammation interstitielle caractéristique de la UIP/FPI.

IV) La progression de la fibrose : un phénomène de cicatrisation incontrôlée

La cicatrisation est un processus complexe et dynamique qui se met en place rapidement dans le but de rétablir l'intégrité et l'architecture pulmonaire. Ceci implique de nombreuses molécules solubles telles que les facteurs de croissance, cytokines et chimiokines produites

par différents types cellulaires (cellules épithéliales et endothéliales, cellules mésenchymateuses et cellules immunitaires). La survenue d'un mécanisme fibrotique est probablement la conséquence d'un dérèglement due à une omission des points de contrôles importants au cours de la cicatrisation, induisant des phénomènes entremêlés de destruction des tissus, une persistance de la phase inflammatoire, et une diminution de la régénération tissulaire.

Un modèle de progression en trois phases peut être proposé, comprenant : (i) l'agression épithéliale accompagnée d'une phase inflammatoire, (ii) la phase de prolifération et de migration des fibroblastes, et enfin (iii) la phase de remodelage par dépôt excessif de matrice extracellulaire. Ce modèle n'est pas spécifique de la FPI mais commun à la plupart des maladies fibroprolifératives. Cependant, il est important de noter que la fibrose est un processus dynamique dans lequel ces différentes phases s'entremêlent.

1) La phase inflammatoire

L'agression épithéliale liée à une infection ou une blessure, peut perturber l'intégrité épithéliale et endothéliale conduisant à la phase inflammatoire qui implique un certain nombre de processus moléculaires ayant pour but le recrutement et l'activation de cellules inflammatoires au niveau du site de la lésion. Cette réponse inflammatoire peut être divisée en deux phases principales ; **une phase vasculaire** (œdème, vasodilatation et hémostasie), et **une phase cellulaire** (recrutement de leucocytes et médiateurs inflammatoires). La résolution de l'inflammation par un processus normal de cicatrisation, restaure l'architecture tissulaire normale. Cependant, dans la plupart des conditions fibrotiques, on constate une persistance de l'irritation causée par les différents agents incriminés ou d'autres facteurs inconnus, ce qui empêcherait la résolution de la phase inflammatoire (King, Pardo et al. 2011).

(a) La phase vasculaire

Au niveau de l'appareil respiratoire une atteinte inflammatoire aiguë, déclenchée par exemple par une infection virale ou l'inhalation d'irritants va se traduire rapidement par l'activation des processus de défense bronchique non spécifiques. A ce phénomène, participent en particulier les macrophages qui sont présents en grand nombre au niveau des voies aériennes *via* la libération de neuropeptides pro-inflammatoires (Substance P et tachykinines) situés dans les terminaisons nerveuses de la muqueuse. Cette activation va se traduire par une hypersécrétion glandulaire, une vasodilatation et une extravasation des vaisseaux de la sous muqueuse permettant l'afflux des polynucléaires neutrophiles dans la lumière. La migration des leucocytes de l'espace vasculaire vers les espaces interstitiels est modulée par la sécrétion de

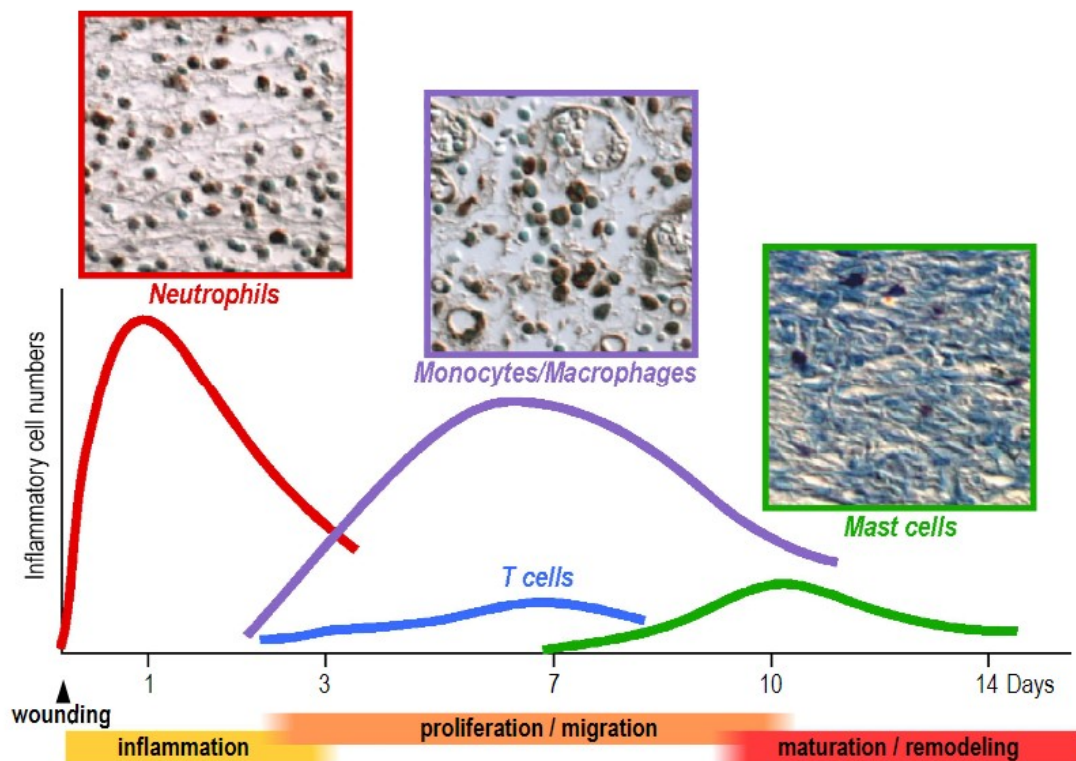


Figure 2 : Recrutement de cellules inflammatoires vers les sites des lésions tissulaires au cours du temps. Les graphiques indiquent les cinétiques de recrutement des neutrophiles, des macrophages, des lymphocytes T et des mastocytes dans une réponse typique de cicatrisation d'une plaie chez la souris, superposées aux phases de réparation tissulaire. Les images d'immunohistochimie montrent les neutrophiles et les macrophages au niveau de la plaie et les mastocytes révélés par histochimie marqués au bleu de toluidine (D'après Stramer 2007)

chimiokines (IL8, IL10, RANTES, MCP-1...). Le tonus vasculaire et la vasomotricité sont assurés par les fibres musculaires lisses de la paroi des vaisseaux et sont régulés par des molécules produites par les cellules endothéliales elles-mêmes. Ces molécules favorisent soit la vasoconstriction (endothéline-1, thromboxane A2) soit la vasodilatation (NO, PGI-2). La production de ces molécules vasoactives est elle-même soumise à l'action de différents médiateurs de l'inflammation : thrombine, bradykinine, histamine, eicosanoïdes, cytokines et facteurs de croissance (IL1, TNF, TGF- β , PDGF, EGF...). La production à la fois de molécules prothrombiniques (facteur VIII, PAF, TXA2, facteur V...) et de molécules anti-thrombotiques (héparanesulfate, PGI-2, NO, thrombomoduline, protéine S, activateurs du plasminogène...) permet le contrôle de l'équilibre fibrino-formation/fibrinolyse (Wynn 2011). De plus, les cellules endothéliales sont capables de lier et d'activer certains facteurs plasmatiques de la coagulation (facteur IX, X, XII, facteur tissulaire...) dans le but de stopper l'afflux sanguin par la formation d'un clou plaquettaire riche en fibrine (Keane, Arenberg et al. 1997 ; Horowitz and Thannickal 2006). Il a été rapporté que la thrombine est fortement exprimée dans les poumons et l'espace intra-alvéolaire dans les pneumopathies interstitielles diffuses (Hernandez-Rodriguez, Cambrey et al. 1995), suggérant que la formation du clou plaquettaire est activée de manière continue. La thrombine peut aussi activer directement les fibroblastes, augmenter leur prolifération et leur différenciation en myofibroblastes (Bogatkevich, Tourkina et al. 2001). Ainsi, les dommages causés au niveau de l'épithélium respiratoire, spécialement au niveau des pneumocytes alvéolaires peuvent induire une cascade anti-fibrinolytique et engendrer un œdème interstitiel, une inflammation aiguë associés à un microenvironnement riche en chimiokines, cytokines proinflammatoires et facteurs angiogéniques (Vaccaro, Brody et al. 1985).

(b) La phase cellulaire

Une fois le site du dommage atteint par une infiltration plasmatique alvéolaire des cellules inflammatoires (neutrophiles, éosinophiles, lymphocytes et macrophages), le gradient de chimiokines augmente, permettant de nettoyer par phagocytose les débris cellulaires provenant de la nécrose. Les cellules qui interviennent dans les mécanismes de l'inflammation sont d'une part des cellules circulantes qui migrent vers le tissu interstitiel et d'autre part des cellules résidentes des tissus interstitiels (**Figure 2**). Les macrophages alvéolaires jouent un rôle important et central dans ce processus, ils relarguent des facteurs chimio-attractants pour les neutrophiles, comme les leukotriènes B4 ou l'IL-8. Outre les macrophages alvéolaires et

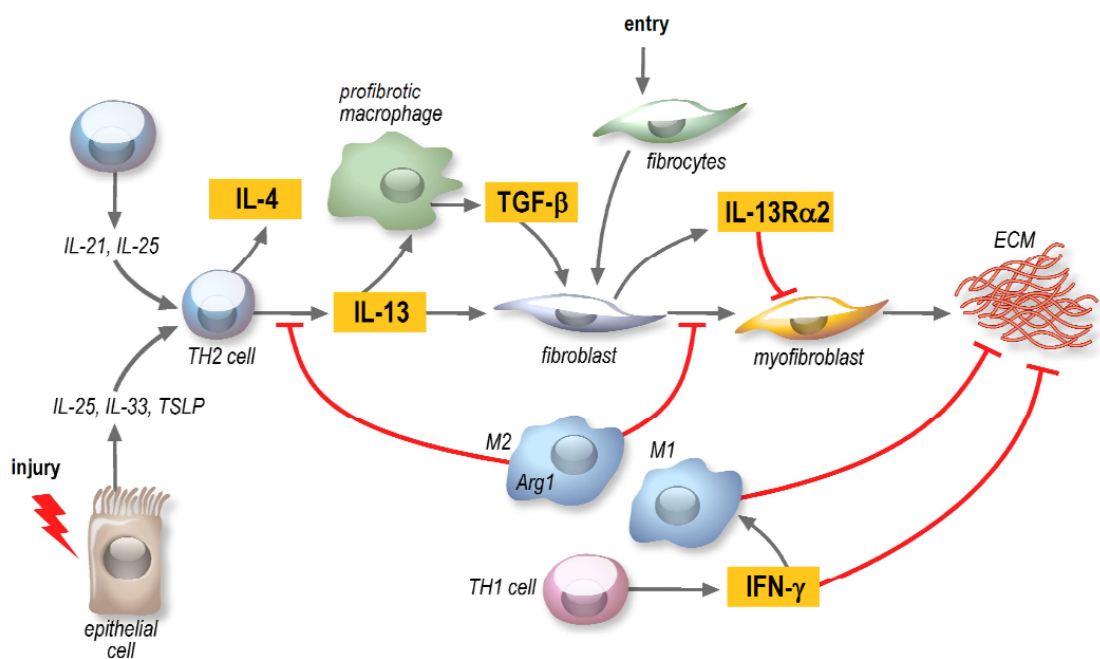


Figure 3 : Les Sous-ensembles de cellules spécialisées; lymphocytes T auxilliaires et les macrophages jouent des rôles distincts dans la fibrose pulmonaire. Après une blessure, les cellules épithéliales libèrent diverses interleukines: IL-25, IL-33, et TSLP (Thymic stromal lymphopoietin), ce qui facilite le développement d'une réponses Th2 profibrotique. Les lymphocytes T libèrent également de l'IL-21 et IL-25, qui favorisent la différenciation Th2. Les cellules Th2 libèrent IL-4 et IL-13, qui favorisent le développement d'une sous-population de macrophages profibrotiques qui sécrètent, parmi d'autres médiateurs, du TGF-β1. L'IL-13 peut aussi activer directement les fibroblastes indépendamment du TGF-β1. Les cytokines Th2 activent des chimiokines spécifiques qui favorisent le recrutement des fibrocytes. Les myofibroblastes résultants libèrent de la MEC. Cependant, les cytokines Th2 peuvent également déclencher des mécanismes de rétroaction antifibrotique. Par exemple, les cytokines Th2 activent l'arginase -1 dans les macrophages M2, qui inhibent la production d'IL-13 et la différenciation des myofibroblastes. De plus, l'IFN-γ produit par les cellules Th1 présente une activité anti-fibrotique puissante en supprimant d'une part la synthèse du collagène dans les fibroblastes, et en contribuant à l'activation des macrophages M1 inflammatoires qui favorisent la dégradation de la MEC (D'après Wynn 2011)

des neutrophiles, l'inflammation est associée à une augmentation du nombre des lymphocytes, éosinophiles, basophiles et mastocytes (Wynn 2011).

L'influence des cellules inflammatoires dans la FPI reste un sujet de controverse. Le fait que les agents anti-inflammatoires n'aient démontré que peu ou pas d'efficacité sur les patients atteint de FPI, suggère que la contribution de l'inflammation dans la pathogenèse de la FPI n'est pas significative. Néanmoins, de nombreuses études suggèrent que c'est notre méconnaissance de l'agent responsable du déclenchement de la FPI qui limite la compréhension des mécanismes inflammatoires engendrés. En effet, une inflammation durant les stades précoces de la maladie pourrait représenter la cause du dérèglement de l'activation des phénomènes de cicatrisation, en polarisant la réponse immune contre des agressions répétées. Ce serait donc plutôt une question de cinétique et de stade de la pathologie (Selman, King et al. 2001). La présence de complexes immuns dans les poumons de patients IPF est en accord avec une réponse immune associée à la pathologie (Dall'Aglia, Pesci et al. 1988). La nature des antigènes reste mystérieuse, mais ils pourraient être des autoantigènes (Kravis, Ahmed et al. 1976 ; Dall'Aglia, Pesci et al. 1988). D'autres arguments, provenant d'études sur des modèles murins indiquent que les souches répondant aux agressions du tissu épithélial par une réponse de type Th2 (T-helper) sont plus sensibles que celles avec une réponse de type Th1 (Horowitz and Thannickal 2006). Alors que la réponse de type 1 est considérée comme pro-inflammatoire et anti-fibrosante (IFN γ , TNF α et IgG2), la réponse de type 2, *via* la production des cytokines telles que l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-13 provoque une inhibition de la ré-épithélisation (Wynn 2011). Bien que ce phénotype de type Th2 ne soit pas complètement établi chez les patients atteints de FPI, il a été montré que 2 chimiokines régulées par des cytokines de types Th2, CCL17 et CCL22 sont fortement exprimées dans les tissus fibrotiques (Agostini and Gurrieri 2006 ; Steinman 2007).

Les cytokines de type Th2 peuvent recruter, activer et induire la prolifération des fibroblastes (Wynn 2004). Ainsi, l'IL-4 augmente la production de MEC par les fibroblastes, et peut parallèlement par des mécanismes indirects induire l'activation des monocytes par la voie alternative (IL-4, IL-13, IL-10, M-CSF) en macrophages de type M2, possédant une fonction d'immunosuppression et de remodelage matriciel produisant du TGF- β (transforming growth factor-beta) et PDGF (platelet-derived growth factor) (**Figure 3**) (Trujillo, O'Connor et al. 2008; Pechkovsky, Prasse et al. 2010 ; Sun, Louie et al. 2011 ; Wynn 2011). L'IL-13 peut aussi indirectement induire l'activation du TGF- β en activant la plasmine et MMP-9. Ainsi, l'inhibition de l'IL-13 réduit la déposition de collagène dans plusieurs modèles expérimentaux de fibrose (Belperio, Dy et al. 2002 ; Kolodsick, Toews et al. 2004).

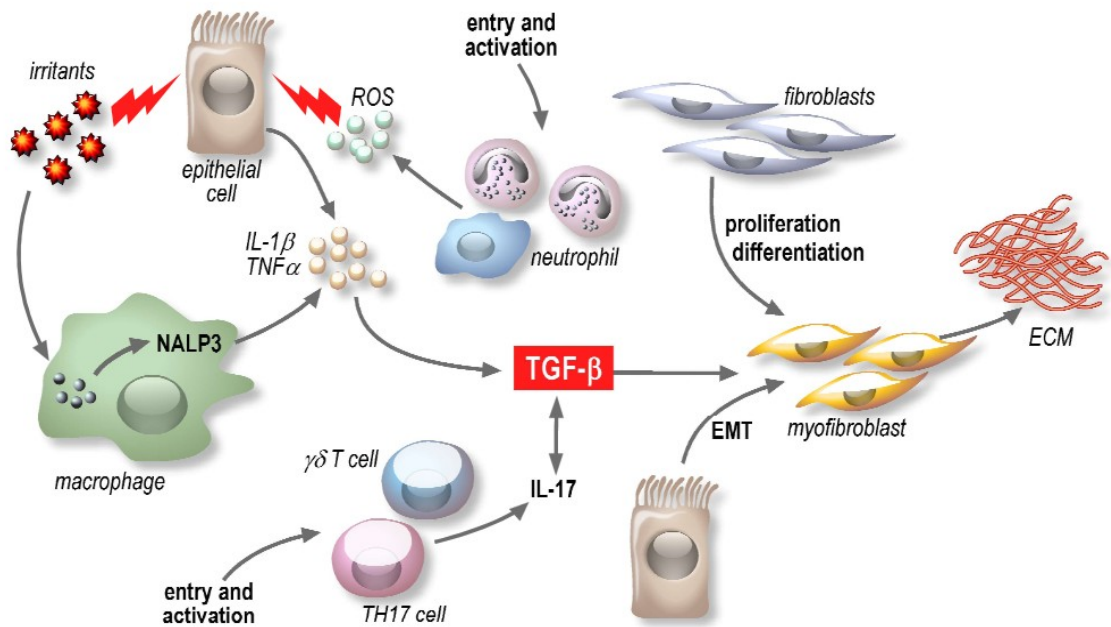


Figure 4 : Médiateurs pro-inflammatoires et pro-fibrotiques dans l'initiation et le maintien de la fibrose. Les irritants comme la silice, l'amiante et la bléomycine peuvent endommager les cellules épithéliales pulmonaires et être détectées par l'inflammasome Nalp3 dans les macrophages. Ces irritants stimulent la production de ROS, de chimiokines et de cytokines. Ces médiateurs inflammatoires favorisent le recrutement et l'activation des leucocytes au site de la lésion tissulaire. Par exemple, l'IL-1 β induit l'activation des ROS par les neutrophiles, qui peuvent endommager les cellules épithéliales. L'IL-1 β favorise également la production de TGF- β 1, une cytokine profibrotique importante qui déclenche la prolifération et l'activation des fibroblastes. Le TGF- β 1 cible également les cellules épithéliales, induisant la TEM et la formation des myofibroblastes produisant de la MEC. Le TGF- β 1 aggrave la réponse inflammatoire en stimulant la différenciation des cellules Th17 (D'après Wynn 2011)

Plus récemment, 2 autres sous-populations de lymphocytes T, jouant une fonction majeure dans la régulation de la réponse immune, les Th17 et T régulateurs (Tregs) ont été également impliqués dans la pathogénèse de l'IPF (Wick, Backovic et al. 2010). La sous-population Th17, qui produit l'IL-17 a été impliquée dans la pathogénèse des maladies autoimmunes et la réponse allergique (**Figure 4**). Cette sous-population pourrait aussi être amplifiée en réponse au TGF- β dans le tissu fibrotique, et promouvoir la production de collagène. La sous-population « Tregs » a pour fonction d'inhiber la réponse immune (à la fois de type Th1 et Th2) afin de maintenir l'homéostasie du système et la tolérance contre les auto-antigènes (Horowitz and Thannickal 2006). Des études récentes suggèrent un rôle pour les Tregs dans la pathogénèse de plusieurs pathologies interstitielles pulmonaires (Miyara, Amoura et al. 2006 ; Grunewald and Eklund 2007), dont l'IPF (Kotsianidis, Nakou et al. 2009), avec une diminution du nombre de lymphocytes Tregs à la fois dans le sang et le liquide bronchoalvéolaire des patients. Une corrélation entre ce défaut de fonction régulatrice et différents paramètres de sévérité de la maladie a été démontrée, suggérant que cette dysfonction pourrait être utilisée comme facteur de prédiction pour la progression de l'IPF. En résumé, l'inflammation et le recrutement de granulocytes, monocytes, macrophages, sous populations distinctes de lymphocytes et fibroblastes est nécessaire à un processus de cicatrisation efficace. Il s'avère qu'un déséquilibre entre le recrutement cellulaire et la production de cytokines et chimiokines, peut induire un excès de facteurs profibrotiques comme le TGF- β , et promouvoir l'activation et la persistance des myofibroblastes dans le site endommagé et va ainsi faire basculer une réparation cicatricielle normale vers une réaction fibrosante pathologique.

2) La phase de prolifération et de migration

Cette deuxième phase est très importante pour la préparation de la phase finale de remodelage. En effet, elle assure la reconstitution d'une MEC provisoire (collagène de type III) favorisée par la migration et prolifération des myofibroblastes dans le foyer cicatriciel qui va assurer la contraction, ceci s'accompagnant d'une ré-épithélialisation, ainsi que d'une néoangiogénèse. Durant cette phase, se forme un néo-tissu qui est initialement imparfait. La phase proliférative est orchestrée par la production de vagues successives de facteurs de croissance avec un effet de cascade selon un minutage précis, et reste dépendante des conditions vasculaires et nutritionnelles.

D'après les études réalisées sur la cicatrisation de l'épiderme, la ré-épithélisation au niveau du site de blessure va permettre de rétablir la fonction essentielle de barrière et

réorganiser la structure tissulaire. La restitution épithéliale va s'effectuer de façon centripète en quelques heures à partir du moment de la blessure. De plus les cellules épithéliales peuvent migrer afin de couvrir la blessure (Zhao, Song et al. 2003). Différents facteurs régulent la ré-épithélialisation comme le TGF- α , le KGF ou bien encore MMP-7, elle-même régulée par TIMP-1, alors que le TGF- β l'inhibe (Chen, McGuire et al. 2008).

Les fibroblastes résidents s'activent principalement sous l'influence du facteur de croissance TGF- β 1 et migrent autour du site d'endommagement à proximité de l'épithélium alvéolaire. La différenciation de fibroblaste en myofibroblaste implique l'action de facteurs de croissance (TGF- β 1), mais aussi de la matrice extracellulaire, notamment par l'intermédiaire de contraintes mécaniques. Lors de la contraction de la plaie, les fibroblastes et myofibroblastes participent à la synthèse, au regroupement et à l'alignement des fibres de collagène, le principal constituant du tissu cicatriciel. Leurs pseudopodes s'allongent et l'actine se lie à la fibronectine, attache les fibres de collagène et se rétracte en tractant les fibres de collagène vers les cellules. Les myofibroblastes sont ensuite éliminés par apoptose une fois la blessure refermée. Le contexte inflammatoire favorise l'activation des fibroblastes résidents ou le recrutement de fibrocytes circulants (se référer au paragraphe VI, page 34). Les myofibroblastes activés expriment des fibres de stress et de l' α -SMA (α -smooth muscle actin) et possèdent ainsi des propriétés contractiles, régulant l'orientation des fibres de collagène (Zhang, Rekhter et al. 1994 ; Hinz, Phan et al. 2007).

3) Lien entre angiogénèse et fibrose

Peu d'études considèrent le remodelage vasculaire dans la fibrose pulmonaire malgré sa contribution potentielle à la progression de la maladie. D'après Strieter et Abraham (Abraham and Varga 2005; Strieter, Gomperts et al. 2007), l'équilibre entre les facteurs pro-angiogéniques et anti-angiogéniques régule le remodelage vasculaire et joue un rôle important dans différentes maladies fibroprolifératives comme la sclérodermie systémique mais aussi la fibrose pulmonaire. Ces mécanismes d'angiogénèse sont régulés principalement par le VEGF, le FGF-2, le TGF- β , le PDGF, l'Angiopoietine 1, mais aussi plusieurs cytokines et chimiokines, en particulier la famille des chimiokines CXC.

Parmi ces facteurs, le VEGF est un des facteurs pro-angiogéniques les plus puissants, induisant à la fois l'activation de la prolifération, la migration et la différenciation des cellules endothéliales mais également une induction de la perméabilité vasculaire. Il est fortement exprimé par les cellules épithéliales alvéolaires, les macrophages, les cellules du muscle lisse, et les myofibroblastes dans les poumons (Monacci, Merrill et al. 1993). Le VEGF semble

jouer un rôle important dans la pathogénèse de la fibrose pulmonaire, en augmentant notamment la migration des leucocytes, la perméabilité vasculaire et la néo-angiogenèse (Fehrenbach, Kasper et al. 1999; McKeown, Richter et al. 2009). Cependant, certaines études semblent contradictoires, montrant une diminution du taux de VEGF à la fois dans le sérum et les lavages broncho alvéolaires chez des patients atteints de FPI, cette diminution étant associée à une perte des capillaires bronchiques (Meyer, Cardoni et al. 2000). Il est néanmoins possible que la diminution d'expression du VEGF chez les patients soit due à sa protéolyse par la plasmine et la trypsine, présentes en grande quantité chez les patients.

Un autre facteur angiogénique produit par les fibroblastes, le FGF, a été montré surexprimé dans les pneumopathies interstitielles usuelles, et semble stimuler l'angiogenèse dans les bronchiolites oblitérantes (Lappi-Blanco, Soini et al. 2002). Son expression est élevée dans l'épithélium pulmonaire, et diminuée dans les foyers fibroblastiques, ce qui est similaire au VEGF, diminuant ainsi la densité capillaire dans cette région riche en fibroblastes.

Des études d'expression de gènes chez les patients atteints de FPI révèlent également une dérégulation des gènes régulés par le facteur de transcription HIF- α , notamment des facteurs pro-angiogéniques (Tzouvelekis, Harokopos et al. 2007), suggérant que l'augmentation du taux d'hypoxie serait responsable de la prolifération des cellules endothéliales mais aussi du recrutement de cellules angiogéniques circulantes. De même, l'IGF, le PDGF, le TGF- β jouent tous un rôle pro-angiogénique fortement associé à la pathogénèse de la fibrose pulmonaire (Cao, Guo et al. 2000).

Enfin, plusieurs chimiokines CXC se sont avérées être dérégulées dans l'IPF. Ces chimiokines sont pro-angiogéniques (liaison au récepteur CXCR2) ou bien anti-angiogéniques (liaison au récepteur CXCR3) selon la présence de séquences de trois acides aminés (acide glutamique-leucine-arginine) connues sous le motif ELR. Les lavages bronchoalvéolaires de patients atteints de FPI sont riches en ELR+CXC pro-angiogéniques (CXCL1, 2, 3, 5 et 8), alors que les ELR-CXC angiostatiques (CXCL4, 9, 10, and 11) sont sous exprimées (Keane, Arenberg et al. 1997 ; Antoniou, Tzanakis et al. 2008; Hanumegowda, Farkas et al. 2012). Ce déséquilibre de chimiokines est aussi observé dans les modèles animaux de fibrose pulmonaire (Wynn 2007).

Ainsi, un ensemble complexe de facteurs angiogéniques et angiostatiques sont perturbés dans la fibrose pulmonaire à la fois chez les patients et dans les modèles animaux à des stades différents, induisant ainsi une hétérogénéité spatiale et temporelle du réseau capillaire observé chez les patients atteints de FPI (Wilson and Wynn 2009).

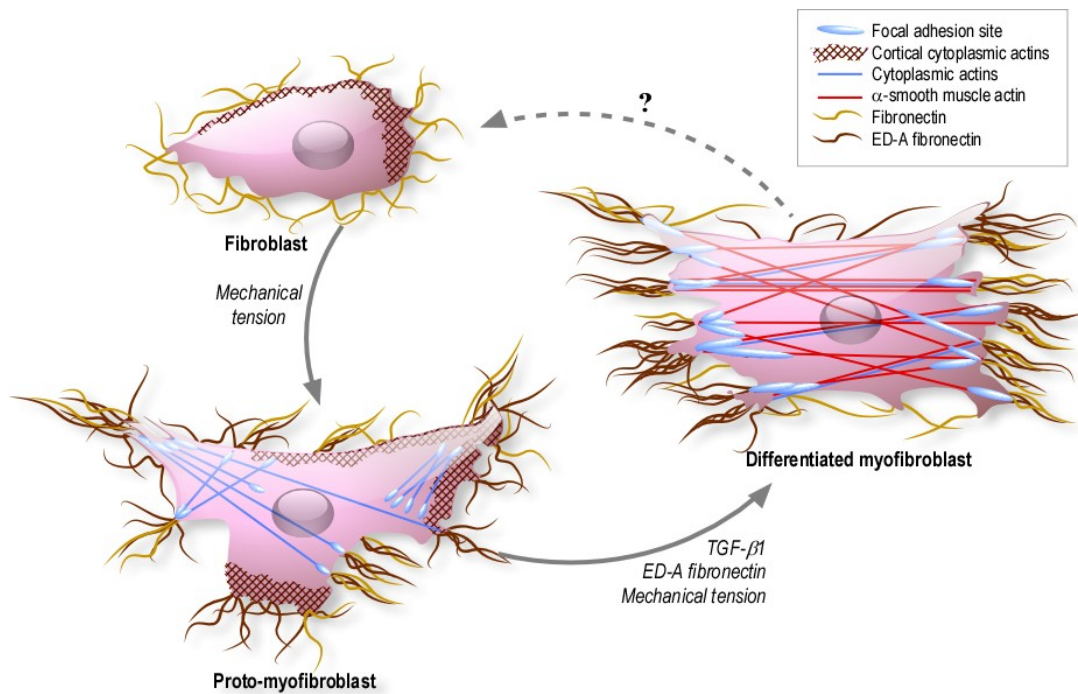


Figure 5 : L'activation des fibroblastes

Soumis à un stress mécanique, les fibroblastes se différencient en protomyofibroblastes. Il y a formation des fibres de stress se terminant par des complexes d'adhésion focaux appelés fibronexus. Les protomyofibroblastes expriment et organisent la fibronectine cellulaire à leur surface. Ces cellules peuvent générer une force contractile, mais lorsque celles-ci sont stimulées au TGF- β en présence d'un stress mécanique et de fibronectine ED-A, elles se différencient en myofibroblastes et peuvent alors générer une force contractile beaucoup plus élevée. Les myofibroblastes expriment des fibres de stress riches en α -actine de muscle lisse et développent d'importants complexes d'adhésion supermatures (D'après Tomasek 2002)

4) La phase de remodelage

Bien que cette phase soit capitale pour la qualité structurale et fonctionnelle du tissu final, elle reste encore mal étudiée. La plupart des études qui visent à élucider ce processus proviennent de systèmes *in vitro* de cicatrisation épidermique. Cette phase va permettre une réorganisation du néo-tissu obtenu en fin de phase proliférative.

La phase de remodelage est marquée par une contraction de la plaie du à la présence des myofibroblastes, associée à une dégradation des fibres de collagènes de type III par les MMPs qui va être remplacée par un collagène plus résistant (collagène de type I) et l'élastine. L'attachement des myofibroblastes à la MEC se fait dans des sites spécialisés appelés Fibronexus (Jonctions de fibronexus ou bien adhésions focales matures) permettant de réduire la taille de la lésion durant la phase de contraction. Le nombre de myofibroblastes activés va déterminer la quantité de dépôt de collagène. En parallèle, la balance entre la quantité de MMPs /TIMPs et collagènes, va varier tout au long de cette phase. Pour contrôler le dépôt de collagène, des signaux d'apoptose vont empêcher la prolifération des fibroblastes, ce qui s'accompagne par une diminution de l'inflammation, une résorption du tissu de granulation laissant place à une lésion riche en collagène. L'élimination des cellules inflammatoires et plus spécialement des myofibroblastes est essentielle pour stopper le dépôt de collagène (Fattman 2008). Cependant, chez les patients atteints de FPI, les myofibroblastes sont résistants à l'apoptose (Plataki, Koutsopoulos et al. 2005 ; Fattman 2008). Les mécanismes moléculaires impliqués dans cette résistance à l'apoptose sont multiples, avec une influence de différents facteurs, comme les cytokines, facteurs génétiques, et l'influence de voies anti-apoptotiques similaires a certaines cellules cancéreuses (Plataki, Koutsopoulos et al. 2005). De plus, les capacités de réépithélisation alvéolaire par les pneumocytes II sont altérées sous l'effet de facteurs apoptotiques libérés par les myofibroblastes (Fang 2000), notamment via la production excessive de MEC et de MMPs induisant des lésions de la membrane basale. Ce dépôt dense de MEC est responsable de la distorsion de l'architecture du poumon (Wilson and Wynn 2009).

V) Les myofibroblastes

Les myofibroblastes sont des cellules mésenchymateuses de phénotype hybride, regroupant un phénotype proche d'un fibroblaste tout en ayant des caractéristiques de cellules du muscle lisse. Elles synthétisent de la MEC de manière excessive et possèdent un cytosquelette de β et γ -actine mais aussi d' α -actine du muscle lisse α -SMA, ce qui leur confère des propriétés contractiles associée à des changements morphologiques et à l'expression de fibres de stress

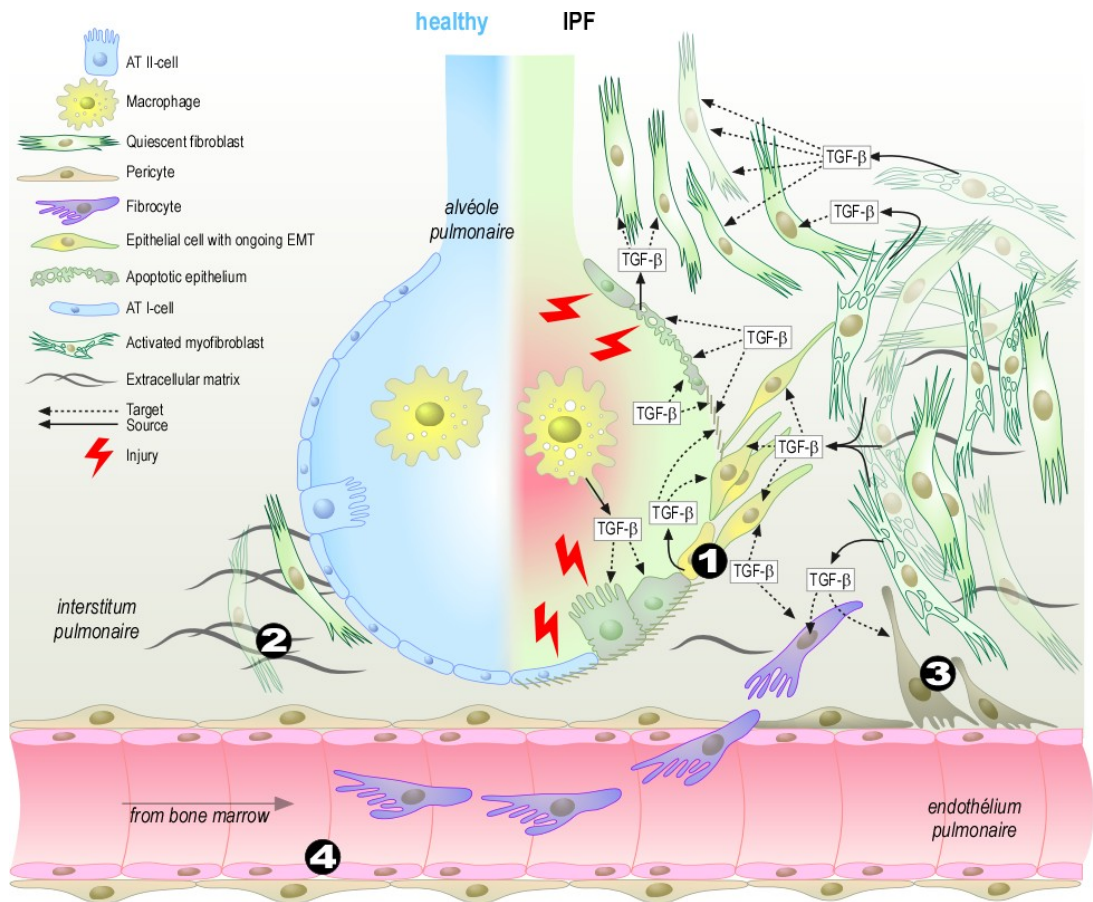


Figure 6 : Origines des myofibroblastes

Schéma hypothétique sur le rôle du TGF- β dans la FPI et les sources potentielles d'activation des myofibroblastes. (1) Les agressions multiples sur l'épithélium respiratoire alvéolaire induisent l'apoptose des pneumocytes de type I et II, une perturbation de la membrane basale et une production de TGF- β par les macrophages et les cellules épithéliales agressées. Ces cellules épithéliales peuvent se transformer en myofibroblastes par transition épithélio-mésenchymateuse. (2) Les myofibroblastes peuvent aussi être recrutés par les fibroblastes résidents, (3) par transition endothélio-mésenchymateuse, (4) ou bien encore par des fibrocytes dérivés de la moelle osseuse (D'après Fernandez 2012)

(**figure 5**). L'autre caractéristique des myofibroblastes, également similaire à celle des cellules du muscle lisse, est la présence de jonctions communicantes (GAP Junctions) augmentant les communications inter cellulaires. L'une des hypothèses qui pourrait expliquer leur phénotype hybride est la diversité de leurs origines (**figure 6**). Cohnheim fut le premier à décrire les myofibroblastes en les appelant « éléments cellulaires contractiles » en pensant qu'ils provenaient de différenciation de leucocytes infiltrés (Cohnheim J, 1867). La définition exacte d'un myofibroblaste reste encore aujourd'hui un sujet de controverse. Les myofibroblastes jouent un rôle important dans la cicatrisation et le rétablissement de l'intégrité tissulaire dans des conditions normales, mais sont associés à plusieurs pathologies comme les maladies fibrotiques mais également les cancers épithéliaux dans lesquels les myofibroblastes (appelés « Cancer Associated Fibroblasts », CAFs) infiltrent la tumeur et potentialisent la survie et l'invasion des cellules tumorales (Madar, Goldstein et al. 2013).

1) Origine des Myofibroblastes

L'origine précise des myofibroblastes dans la fibrose pulmonaire n'est pas encore bien établie, bien qu'elle ait fait l'objet de recherches intensives. Les données indiquent que la majorité des myofibroblastes dériveraient des fibroblastes pulmonaires résidents (Hinz, Phan et al. 2007), mais il a été démontré qu'il existe d'autres sources comme les fibrocytes circulants (Phillips, Burdick et al. 2004), les progéniteurs dérivés de moelle osseuse (Hashimoto, Jin et al. 2004), les cellules endothéliales, mésothéliales et épithéliales qui peuvent subir un processus de transition endothélio/mésothélio/épithélio-mésenchymateuse respectivement (Frid, Kale et al. 2002 ; Willis, Liebler et al. 2005; Di Meglio, Castaldo et al. 2010).

(a) Les fibroblastes résidents

La présence de fibroblastes ou protomyofibroblastes stables dans les cloisons alvéolaires, péribrochiolaires et périvasculaires peuvent être la première source de myofibroblastes lors du processus de réparation suite aux agressions pulmonaires (Zhang, Rekhter et al. 1994 ; Hinz, Phan et al. 2007). La différenciation des fibroblastes en myofibroblastes est principalement sous le contrôle du facteur de croissance TGF- β 1 en présence de fibronectine cellulaire (isoforme ED-A). Il a été suggéré en utilisant des fibroblastes de patients atteints de sclérodémie systémique (SSc) que le signal TGF- β s'enclenchait de manière autocrine. Cependant, d'autres facteurs comme le CTGF (connective tissue growth factor) lui-même activé par le TGF- β , a été montré comme étant associé à une augmentation d'expression d' α -SMA chez des patients atteints de FPI, suggérant son rôle dans la différenciation des

fibroblastes en myofibroblastes (Huang, Qi et al. 2010). Des mécanismes paracrines peuvent aussi entrer en jeu. En effet, la polarisation de la réponse immune induisant la production de cytokines pro-fibrosantes de type Th2 a été évoquée précédemment (se référer au chapitre IV.3).

(b) Les fibrocytes

Les fibrocytes sont des précurseurs dérivés de moelle osseuse, ils ont été identifiés pour la première fois comme une sous-population de leucocytes impliquée dans la réparation tissulaire, avec un phénotype de marqueurs leucocytaires (CD34+ et CD45+) mais aussi mésenchymateux (collagène I et vimentine) (Bucala, Spiegel et al. 1994). Les fibrocytes ont la capacité d'exprimer des récepteurs de chimiokines tels que CXCR4 et CCR7. Il a été montré qu'en présence de TGF- β ou de PDGF (Platelet Derived Growth Factor), les précurseurs mononuclés CD14+ sont recrutés au niveau des cites inflammatoires et se différencient en fibrocytes puis en myofibroblastes sous l'influence de facteurs profibrotiques tels que le TGF- β (Bellini and Mattoli 2007).

(c) Transition épithélio-mésenchymateuse

La transition épithélio-mésenchymateuse (EMT ; Epithelial to Mesenchymal Transition), est un phénomène par lequel une cellule de phénotype épithélial réactive son programme embryonnaire, souvent au cours de pathologies telles que la fibrose ou la progression tumorale et retrouve des caractéristiques mésenchymateuses (Strutz 2009). La transition épithélio-mésenchymateuse se caractérise par quatre étapes : i) une perte de l'adhésion cellulaire, ii) une modification du cytosquelette d'actine, iii) une digestion de la membrane basale et iv) une augmentation du pouvoir migratoire et invasif caractéristique du phénotype myofibroblastique.

Dans la fibrose pulmonaire idiopathique, les mécanismes de l'EMT ont fait l'objet de nombreuses études (Willis, Liebler et al. 2005 ; Leopold, Vincent et al. 2012). Celles-ci indiquent que les agressions au niveau des cellules épithéliales alvéolaires AEC (Alveolar Epithelial Cells) activent la production de médiateurs pro-inflammatoires et se transforment en myofibroblastes par EMT. Différentes voies de signalisations peuvent être responsables de cette transformation comme la voie Wnt/ β catenin (Konigshoff and Eickelberg 2010) ou bien la voie Notch (Matsuno, Coelho et al. 2012), mais le TGF- β est considéré comme étant l'interrupteur principal de cette transition (Kasai, Allen et al. 2005). Le gène Snail est le point convergent dans l'induction de l'EMT (Balli, Ustiyani et al. 2013). Cependant l'EMT est très controversée dans la fibrose pulmonaire. En effet, Rock et ses collaborateurs ont montré en

utilisant des modèles de souris transgéniques permettant de suivre le devenir de sous-populations de pneumocytes, qu'il n'y avait pas d'évidence pour une EMT dans le modèle de fibrose pulmonaire induite par un traitement à la bléomycine chez la souris (Rock, Barkauskas et al. 2011).

(d) Transition endothélio-mésenchymateuse

C'est en 2010 qu'a été démontrée pour la première fois l'implication de la transition endothélio-mésenchymateuse dans le modèle de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine (Hashimoto, Phan et al. 2010). En utilisant une souris transgénique exprimant la β -galactosidase sous le contrôle d'un promoteur spécifique des cellules endothéliales, les auteurs ont pu montrer par une combinaison de marquage X-gal et immunohistochimique (collagène de type I et α -SMA) la présence de myofibroblastes d'origine endothéliale dans les poumons de souris traitées à la bléomycine (Hashimoto, Phan et al. 2010). Bien que cette population ne représente qu'un faible pourcentage des myofibroblastes, ces travaux soulignent l'importance de la composante vasculaire dans la pathogénèse de la fibrose. Cependant, Rock *et al.* ont montré en suivant le devenir des pericytes au niveau de l'interstitium alvéolaire, que ces derniers proliféraient au niveau des régions fibrosées mais n'exprimaient pas des taux élevés de α -SMA, remettant ainsi en cause l'importance de la transition endothélio-mésenchymateuse dans la fibrose pulmonaire (Rock, Barkauskas et al. 2011).

VI) Le facteur de croissance TGF- β

Le TGF- β est la cytokine clé responsable de la progression de nombreuses pathologies fibroprolifératives, dont la FPI. La famille du TGF- β est composée d'une trentaine de membres que l'on retrouve dans tout le règne animal, parmi eux les BMP (Bone Morphogenic Proteins), Activines et les GDF (Growth and Differentiation Factors). Ces cytokines jouent un rôle important dans la détermination du devenir cellulaire au cours de l'embryogenèse et contrôlent un large spectre de réponses biologiques chez l'adulte (Perrot, Javelaud et al. 2013). Les activines sont aussi connues pour leur rôle dans le contrôle hormonal et l'homéostasie. Le TGF- β peut inhiber ou stimuler la prolifération selon le contexte cellulaire, contrôler le remodelage de la MEC ainsi que les interactions épithélio-mésenchymateuses au cours de l'embryogenèse. Ses activités pleiotropes sont impliquées dans la réparation tissulaire et la modulation de la réponse immunitaire. Une dérégulation de la signalisation du TGF- β induit des anomalies au cours du développement embryonnaire et intervient dans différentes pathologies humaines, telles que le cancer, la fibrose tissulaire ou bien les maladies auto-immunes (Clark and Coker 1998; Verrecchia and Mauviel 2002).

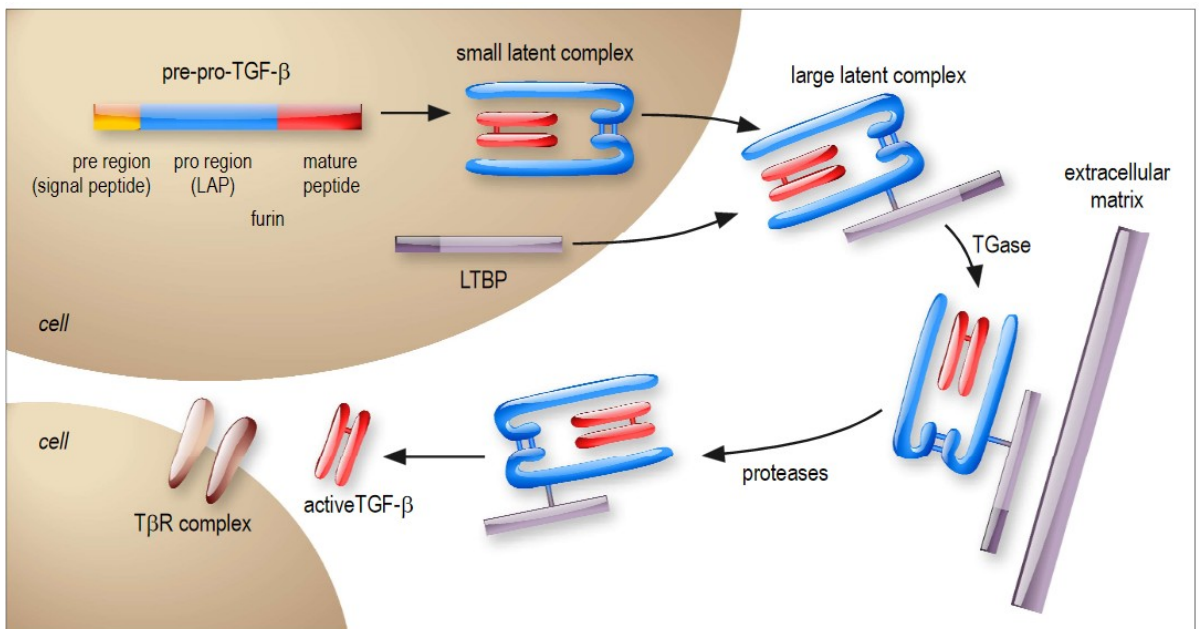


Figure 7 : Synthèse et maturation du TGF-β

Il existe trois isoformes du TGF- β chez l'humain; le TGF- β 1, TGF - β 2 et TGF - β 3, codées par trois gènes distincts, leur synthèse dépendant du type cellulaire (Clark and Coker 1998). Ces isoformes sont du point de vue structural très similaire (neuf résidus cystéines conservés, 76 à 80% d'identité entre les séquences protéiques). Il semblerait que la cytokine TGF- β 1 soit la forme majoritaire (Govinden and Bhoola 2003). L'invalidation de ce gène provoque une létalité de plus 50% des animaux *in utero*, les autres souris succombant à une inflammation chronique non contrôlée (Clark and Coker 1998). Le TGF- β est synthétisé par une grande variété de cellules telles que les macrophages, les cellules mononucléaires et les fibroblastes.

1) Synthèse et maturation du TGF

Le TGF- β est d'abord exprimé sous la forme d'un précurseur peptidique contenant un peptide signal dans la région amino terminale, une région centrale appelée LAP (Latency Associated Peptide) qui constitue le pro-domaine, et dans la région carboxy-terminale un domaine bioactif constituant le TGF- β (**Figure 7**). Ce précurseur subit une modification par la furine, clivant ainsi la liaison entre le TGF- β mature et le LAP qui restent reliées de manière non covalente, donnant naissance à un complexe latent (LTGF- β) (Verrecchia and Mauviel 2007). Le LTGF- β peut être sécrété sous la forme d'un petit complexe latent SLC (Small Latent Complex) ou sous la forme d'un grand complexe latent LLC (Large Latent Complex) lorsque le LAP est associé de façon covalente au LTBP (LTGF- β binding protein). Les LTBPs permettent la fixation du TGF- β à la matrice extracellulaire et son stockage. Ce complexe LTGF- β permet de maintenir le TGF- β dans un état inactif mais facilement activable par protéolyse (plasmine et MMPs) ou changement conformationnel, induit par un changement de pH ou aussi *via* la TSP-1 (Thrombospondine-1) (Murphy-Ullrich and Poczatek 2000). De plus, l'intégrine α (v) β 6 semble également être impliquée dans l'activation pulmonaire du TGF- β latent (Horan, Wood et al. 2008).

2) La transduction du signal

Une fois libéré, le TGF- β induit une transduction de signal intra-cellulaire *via* deux récepteurs membranaires à activité sérine/thréonine kinase, les récepteurs T β RI et T β RII. Ces récepteurs sont composés d'une petite région extracellulaire riche en cystéine et d'un domaine intracellulaire dans lequel est situé leur domaine kinase. Le T β RII possède une activité kinase intrinsèque et son activation par le TGF- β forme un complexe hétérodimérique induisant le recrutement du T β RI qui est à son tour phosphorylé. Il semblerait que l'affinité de liaison du

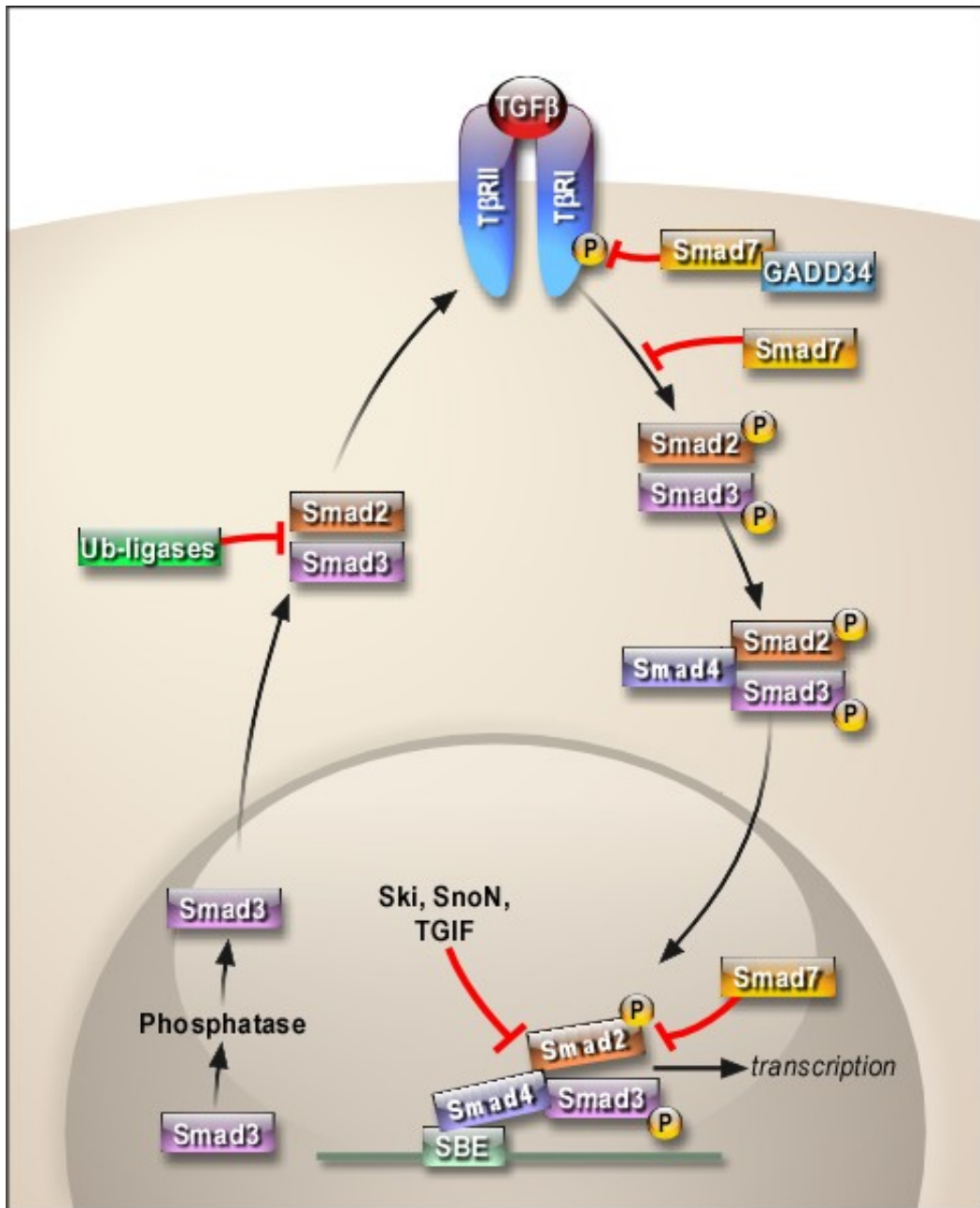


Figure 8 : La voie canonique du TGF- β /Smad ainsi que ses inhibiteurs

TGF- β avec son récepteur T β RII serait améliorée par association au T β RIII (un bêtaglycane transmembranaire).

La transduction du signal des récepteurs jusqu'au noyau est assurée principalement par la phosphorylation d'une famille de protéines cytoplasmiques conservées au cours de l'évolution, les Smads (**figure 8, 9**). Cette famille est divisée en trois groupes fonctionnels différents : les Smads associés au récepteur ou R-Smad (Smad2 et Smad3), qui interagissent de façon spécifique directement avec le T β RI activé, les co-Smads (Smad4), et les Smads inhibiteurs ou I-Smad (Smad6 et Smad7) (Xu, Liu et al. 2012). Une fois le récepteur T β RI phosphorylé, les R-Smads s'associent au co-Smad formant un complexe trimérique qui va être transloqué au noyau et se lier au SBE (Smad Binding Element) 5'-CAGAC-3' présent sur de nombreux promoteurs de gènes modulant la transcription directement ou bien en s'associant à d'autre co-facteurs. Des expériences de transcriptomique ont montré que le TGF- β était impliqué dans la régulation de l'expression de près de 500 gènes (Massague, Seoane et al. 2005). Des expériences de Chip-on-chip anti smad4 dans des kératinocytes HaCat ont révélé 925 sites de fixation de Smad4 (Koinuma, Tsutsumi et al. 2009). La majorité de ces sites ont été retrouvés en réalisant des expériences similaires sur smad3 (Koinuma, Tsutsumi et al. 2009), confirmant que Smad4 joue un rôle d'effecteur central (Massague, Seoane et al. 2005). Les I-Smad (inhibiteurs de Smad) comme Smad7, inhibent la transmission du signal en s'associant au T β RI phosphorylé, empêchant ainsi l'activation des protéines R-Smad (**figure9**). Smad7 peut aussi recruter deux ubiquitines ligases, Smurf1 et Smurf2, induisant ainsi la dégradation du complexe T β RI I/T β RI par la voie du protéasome. L'action inhibitrice de Smad7 représente une boucle de rétroaction négative, étant donné que Smad7 est elle-même induit par le TGF- β (Massague, Seoane et al. 2005).

Cependant, des voies de signalisation alternatives peuvent être induites par le TGF- β , comme la voie des MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) incluant ERK (Extracellular Regulated Kinase), JNK (c-Jun NH2-terminal Kinase) ainsi que p38 MAPK (Extracellular Regulated Kinase) mais aussi la voie des PI3K (Phosphoinositide 3 Kinase) et RhoA GTPase. Les voies de signalisation alternatives peuvent interagir avec la voie classique du TGF- β et moduler son signal (Zhang 2009).

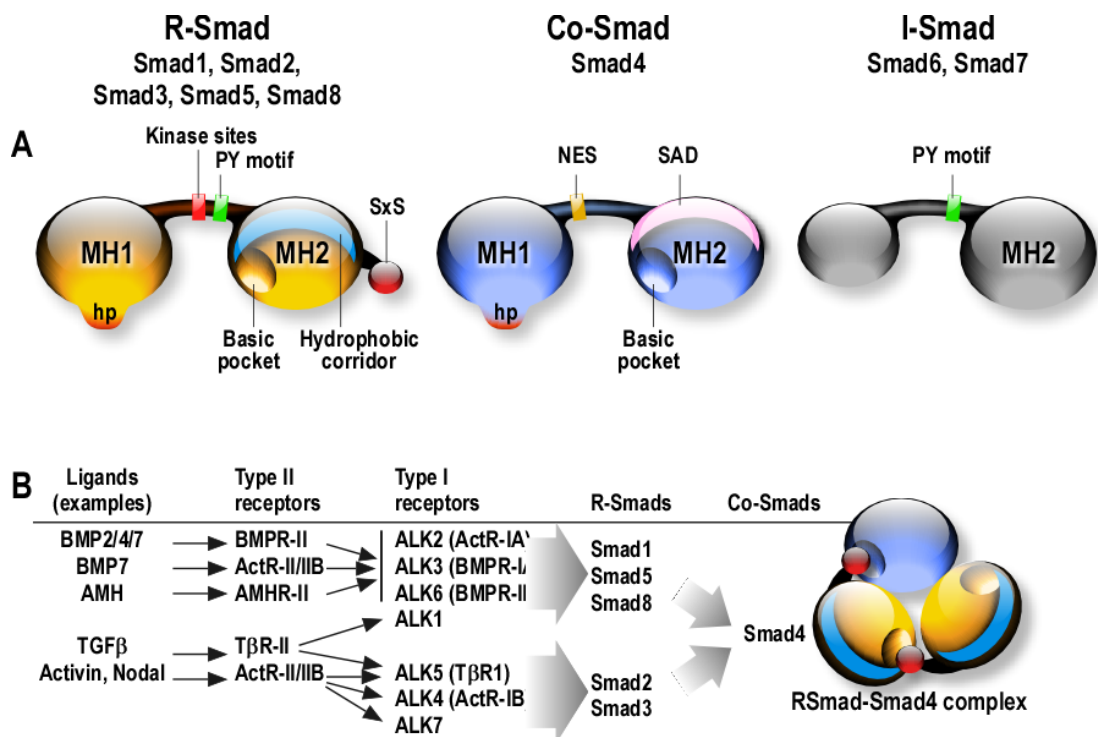


Figure 9 : Les protéines Smads et leurs éléments structuraux. A) Les protéines Smads se composent de deux domaines globulaires conservés (MH1 et MH2) et une région de liaison variable. Le domaine MH1 des **R-Smads** et **Smad4** contient une structure en épingle à cheveux permettant la liaison à l'ADN. Les **I-Smads** n'ont pas de domaine MH1. La région de liaison des R-Smads contient plusieurs sites de phosphorylation de différentes protéines kinases. La région de liaison des R-Smads et I-Smads contient un motif PY permettant la reconnaissance par le domaine WW de l'ubiquitine ligase Smurf. La région de liaison de Smad4 contient une NES. Le domaine MH2 des R-Smads contient une poche de base pour l'interaction avec le récepteur de type I actif, et dans les R-Smads et Smad4 ce domaine sert à la formation de complexes Smads par l'interaction avec le motif pS -x -pS (boule rouge). Sur la surface du domaine MH2 des R-Smads, un ensemble contigu de couloirs hydrophobes sert de site pour de multiples interactions. B) Quelques **membres de la famille du TGF** chez les mammifères et leurs relations avec les cinq récepteurs de type II et les sept récepteurs de type I, les cinq R-Smads, et le Co-Smad unique. Le schéma illustre un complexe Smad hétérotrimérique composé de deux molécules R-Smads et un Smad4 (seuls les domaines MH2 sont affichés). Des **hétérodimères R-Smads - Smad4** ont également été décrits (d'après Massagué, 2005)

1) Présentation des cavéoles

Les cavéoles appartiennent à la famille des rafts lipidiques. Découvertes pour la première fois en 1953 (Razani, Woodman et al. 2002), ce sont des invaginations de la membrane plasmique de 50 à 100 nm qui apparaissent en microscopie électronique sous la forme de « flasques » dont la cavité est reliée au milieu extracellulaire par un col, formant ainsi une forme particulière en « oméga (Ω) inversé ». Elles sont impliquées dans différents processus cellulaires, tels que l'endocytose et la transcytose (Schnitzer, Oh et al. 1994), la potocytose (Anderson, Kamen et al. 1992), le transport du cholestérol (Smart, Ying et al. 1996) mais aussi dans la régulation de signaux intracellulaires (Razani, Zhang et al. 2001). Les cavéoles sont présentes dans la plupart des tissus mais sont plus abondantes dans les adipocytes, les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et striées, les pneumocytes de type 1 et les fibroblastes (Razani and Lisanti 2001). Les cavéoles sont présentes au niveau de la membrane plasmique mais aussi dans le cytoplasme, où elles forment des vésicules de formes différentes. Biochimiquement, les cavéoles se composent de molécules lipidiques (cholestérol, glycosphingolipides et sphingomyéline) ainsi qu'une quantité importante de protéines (les cavéolines) (Razani and Lisanti 2001).

2) Les Cavéolines

La famille des cavéolines (CAV) se compose de trois protéines (CAV-1, -2 et -3) d'environ 22kDa hautement conservées au cours de l'évolution. La CAV-1 possède des régions lipophiles lui permettant de s'insérer dans la membrane plasmique, ses extrémités N et C terminales étant cytoplasmiques. La stabilisation de la protéine à la membrane plasmique est effectuée grâce à trois résidus cystéine palmitoylés. La CAV-1 existe sous deux isoformes CAV-1 α et CAV-1 β , respectivement de 178 et 147 résidus, l'isoforme α étant prédominante. La CAV-2 α se compose de 162 résidus et deux isoformes tronquées ont pu être identifiées : CAV-2 β et CAV-2 γ (Scherer, Okamoto et al. 1996). La CAV-3 quant à elle, n'existe que sous une seule forme de 151 résidus et est exprimée exclusivement dans le tissu musculaire où elle forme des homodimères dans les myocytes. CAV-1 et CAV-2 forment des hétérodimères, et l'adressage de CAV-2 à la membrane plasmique nécessite la CAV-1 (Razani, Woodman et al. 2002).

3) La cavéoline-1 : une protéine de structure des cavéoles

La CAV-1 fut le premier membre de la famille des cavéolines à être identifiée et a servi de modèle pour l'étude de fonction des cavéolines. La région centrale de CAV-1 contient 33

acides aminés hydrophobes qui agissent comme un point d'ancrage à la membrane permettant à la protéine d'adopter sa structure particulière. Son domaine N-MAD (N-terminal membrane attachment domain) permet sa localisation au niveau de la membrane plasmique, alors que son domaine C-MAD (C-terminal membrane attachment domain) lui permet une localisation trans-golgiennne. La CAV-1 est palmitoylée au niveau de trois résidus cystéine (Cys133n Cys143, Cys156) ce qui augmente sa stabilisation et son oligomérisation. Son domaine CSD (Caveolin Scaffolding Domain) lui permet d'interagir avec de nombreuses protéines possédant un domaine CBD (caveolin Binding Domain) (Schlegel, Schwab et al. 1999 ; Razani, Woodman et al. 2002). La CAV-1 est essentielle pour la formation des cavéoles, son expression est suffisante pour générer des cavéoles dans les lymphocytes ou les cellules FRT (Fisher Rat Thyroid) (Fra, Williamson et al. 1995; Lipardi, Mora et al. 1998). De plus, son inhibition dans les souris CAV1-/- montre une disparition totale des cavéoles (Drab, Verkade et al. 2001 ; Razani, Engelman et al. 2001 ; Wang, Zhang et al. 2006).

4) Synthèse et dynamique intra-cellulaire

Le gène de la cavéoline-1 est localisé au niveau du bras du chromosome 7q31.1, proche du locus D7S522 connu comme un site fragile (FRA7G) qui est d'ailleurs souvent délété dans de nombreux cancers (cancer du sein, du colon, du rein, de la prostate..) et qui s'accompagne d'une diminution d'expression de CAV-1(Engelman, Zhang et al. 1998).

La CAV-1 est synthétisée au sein du RE d'une manière dépendante du signal SRP (signal recognition particle), elle passe d'une forme monomérique à une forme oligomérique, des séquences consensus d'acides aminés lui permettent de se lier au cholestérol, ce dernier va réguler son trafic trans-golgien où elle va subir des modifications puis accélère sa sortie pour s'associer à d'autres protéines de transport (SNAREs ; Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor) ainsi que le GPI (glycosyl phosphatidylinositol) et les GM1 (gangliosides), afin de permettre son adressage à la membrane plasmique (Monier, Parton et al. 1995). Malgré son expression majoritaire dans le cytoplasme, une étude montre qu'elle est également retrouvée dans le noyau où elle pourrait réguler l'expression de gènes comme BRCA1 (Breast Cancer 1) jouant ainsi un rôle suppresseur de tumeur en se liant à l'ADN (Glait, Ravid et al. 2006). D'autre part, la CAV-1 peut aussi être sécrétée dans le milieu extracellulaire sous forme de complexe lipoprotéique sécrété par le pancréas (Liu, Li et al. 1999). C'est donc une protéine particulièrement dynamique, qui joue un rôle complexe dans la régulation de l'expression de gènes et de protéines ainsi que de différentes voies de

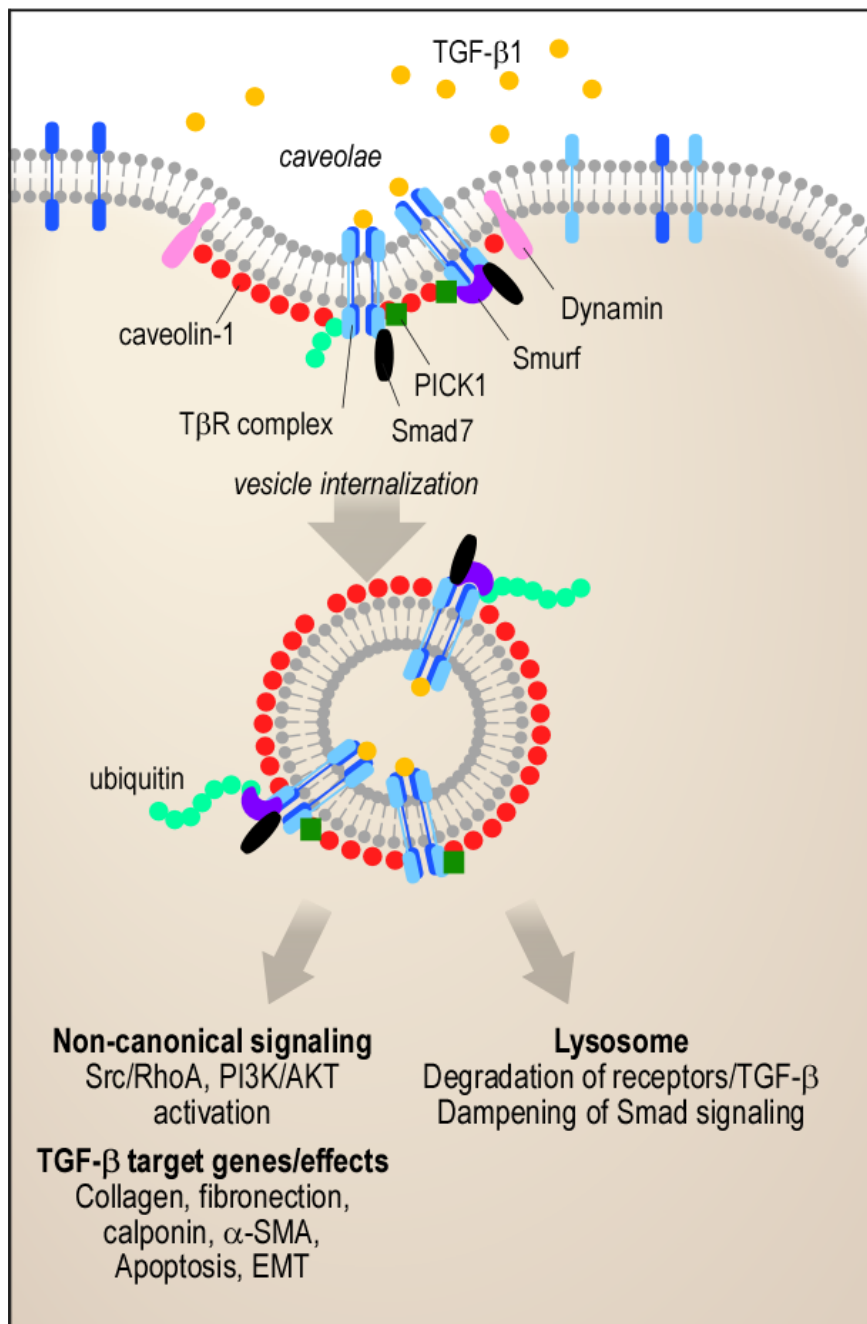


Figure 10 : Cavéoline et signalisation du TGF-β. Ce schéma illustre les effets de la cavéoline-1 sur la cascade de signalisation du TGF-β. Les voies alternatives du TGF- β peuvent être initiées par les cavéoles et peuvent influencer la TEM et l'apoptose. Cependant, la signalisation canonique Smad est inhibée par la dégradation du récepteur par les cavéoles (D'après Meyer 2013)

signalisation comme celle du PDGF (Liu, Ying et al. 1996), de l'EGF (Mineo, James et al. 1996) mais aussi du TGF- β /Smad (Razani, Zhang et al. 2001).

5) Cavéoline, TGF- β et fibrose pulmonaire

L'inhibition du gène CAV-1 chez la souris a révélé la grande importance de cette protéine et son rôle dans différentes pathologies telle que le cancer, les maladies cardiovasculaires et la fibrose pulmonaire (Razani, Engelman et al. 2001 ; Wang, Zhang et al. 2006). Wang et ses collaborateurs ont ainsi observé une diminution significative de l'expression de CAV-1 dans les tissus pulmonaires et les fibroblastes issus de patients atteints de FPI (Wang, Zhang et al. 2006). Le traitement par le TGF- β sur des fibroblastes pulmonaires *in vitro* induit également une perte d'expression progressive de CAV-1 d'une manière dose-dépendante. Afin de mieux comprendre son impact sur la voie du TGF- β dans la fibrose pulmonaire, des études de gain et de perte de fonction ont été effectuées par Wang et ses collaborateurs. La surexpression de CAV-1 *in vitro* accompagnée d'un traitement TGF- β , diminue la stimulation de l'expression de collagène I, de fibronectine, et d' α -SMA, inhibant donc la transformation des fibroblastes en myofibroblastes. Ces résultats ont été confirmés *in vivo*, en surexprimant CAV-1 via un vecteur adénoviral, diminuant considérablement les effets pro-fibrotiques observés après instillation de bleomycine chez les souris. D'autres études renforcent cette observation en montrant une régulation similaire dans les monocytes dans la fibrose pulmonaire (Tourkina, Richard et al. 2010) ainsi que dans l'acquisition du phénotype myofibroblastique des CAFs (Cancer associated fibroblasts) (Martinez-Outschoorn, Pavlides et al. 2010). Les fibroblastes embryonnaires de souris (MEFs) CAV-1-/- possèdent un phénotype de myofibroblastes (Razani, Engelman et al. 2001 ; Razani, Woodman et al. 2002). D'autre part, Razani et ses collaborateurs ont été les premiers à mettre en évidence l'interaction entre le domaine CSD de la CAV-1 et le récepteur T β RI dans les fibroblastes de souris. Cette interaction induit une inhibition de la phosphorylation de Smad2 et par conséquent inhibe la voie du TGF- β /Smads (Razani, Zhang et al. 2001). De plus, la surexpression de CAV-1 induit également la répression de l'expression du récepteur T β RII au niveau transcriptionnel (Lee, Lee et al. 2007). Les cavéoles possèdent donc un rôle particulièrement important dans la signalisation du TGF- β . Alors que l'endocytose des récepteurs au TGF- β *via* les clathrines favorise la signalisation du TGF- β , la voie d'internalisation dépendante des cavéolines induit une dégradation des récepteurs au TGF- β , diminuant ainsi sa signalisation (**figure 10**) (Chen and Wang 2009).

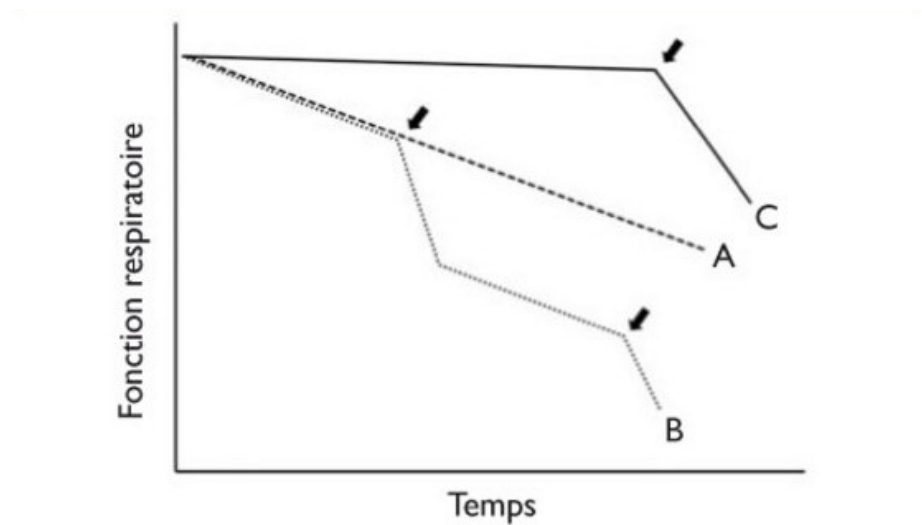


Figure 11 : Profils évolutifs au cours de la FPI

- A) Détérioration lentement progressive sans événement aigu.
- B) Détérioration lentement progressive et survenue d'une exacerbation aiguë non létale. Ultérieurement, récurrence d'exacerbation aiguë létale.
- C) Fibrose infraclinique méconnue jusqu'à la survenue d'une exacerbation aiguë qui révèle l'existence de la FPI (D'après Romain Lazor, 2010 et King, 2011).

VIII) Traitement

Malgré les efforts considérables effectués au niveau de la recherche pharmaceutique, et le nombre croissant d'essais cliniques depuis ces 10 dernières années (Richeldi 2013), il n'y a à ce jour pas de traitement efficace contre la FPI (Selman and Pardo 2002; Raghu and Chang 2004; Wells 2013).

Parallèlement au déclin de la fonction respiratoire, des périodes d'exacerbations aiguës peuvent survenir. Ces exacerbations sont d'un mauvais pronostic avec une mortalité de 78 à 96% (**figure 11**). Les exacerbations aiguës sont caractérisées par une aggravation inexplicée de la dyspnée sur plusieurs jours (jusqu'à 30 jours), une baisse sévère de la pression partielle en oxygène dans le sang artériel (PaO_2), l'apparition de nouvelles anomalies qui viennent s'ajouter aux lésions en rayon de miel visibles en tomodensitométrie à haute résolution (Sakamoto, Taniguchi et al. 2012), et l'absence de cause identifiable (telle que l'infection, l'embolie pulmonaire, l'insuffisance cardiaque congestive, ou le pneumothorax).

Les traitements des symptômes et des complications liés à la fibrose pulmonaire représentent l'essentiel de la prise en charge des patients par les cliniciens, en attendant de nouveaux traitements anti-fibrotiques, actuellement en phase d'essai thérapeutique. Aujourd'hui, la prise en charge des patients atteints de FPI peut être divisée en trois objectifs majeurs : (i) Le traitement symptomatique, (ii) le traitement des complications, (iii) le traitement anti-fibrotique, dans le but de ralentir la progression de la fibrose (Adamali and Maher 2012).

En ce qui concerne ce dernier point, les stratégies thérapeutiques sont assez diverses dans la mesure où la pathogénèse de l'IPF est particulièrement complexe et peut cibler différents compartiments cellulaires. Les principales pistes sont de : i) promouvoir la régénération de l'épithélium ; ii) inhiber le remodelage de la MEC, le remodelage vasculaire, ainsi que les dommages de la membrane basale ; iii) diminuer le stress oxydant ; iv) potentialiser l'immunité innée mais inhiber l'immunité adaptative ; v) inhiber l'activation des fibroblastes en myofibroblastes ou favoriser leur apoptose (**figure 12**).

1) Traitements symptomatiques

Les traitements symptomatiques sont au cœur de la prise en charge de la FPI. Ils visent avant tout à conserver voire améliorer la qualité de vie et l'autonomie des patients. L'oxygénothérapie longue durée est recommandée chez les patients présentant une hypoxémie de repos, par analogie avec la Broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO). La réhabilitation respiratoire pourrait être bénéfique afin d'améliorer l'endurance à

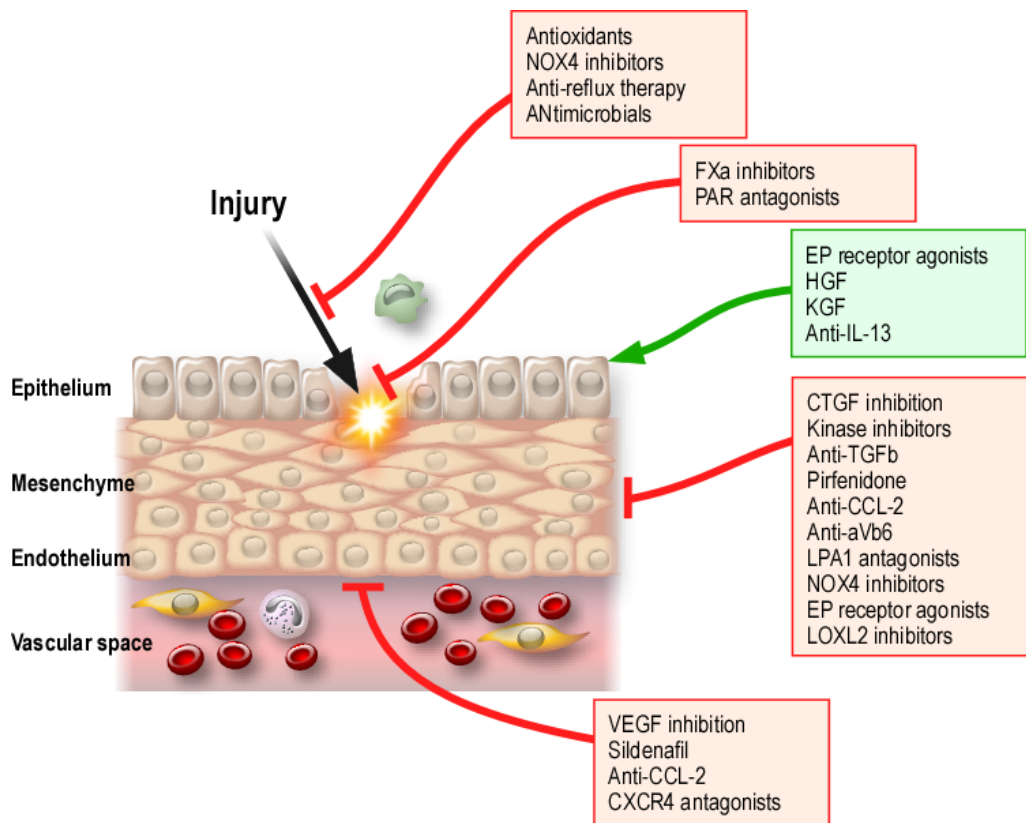


Figure 12 : Vue globale des différentes approches thérapeutiques au niveau des différents compartiments cellulaires dérégulés dans la fibrose pulmonaire idiopathique (D'après Maher 2011)

l'effort. Le dépistage et la prise en charge du Syndrome D'apnée Obstructif du Sommeil (SAOS) permet d'améliorer la qualité de vie des patients concernés. Par ailleurs, la toux représente un symptôme très gênant et responsable d'une dégradation sensible de la qualité de vie des patients souffrant de FPI. Bien qu'aucun traitement antitussif ne soit actuellement recommandé dans cette indication, les opioïdes sont souvent prescrits. Le Thalidomide pourrait être une alternative prometteuse dans cette situation au prix d'effets indésirables non négligeables. Enfin, la dépression et l'anxiété sont très fréquentes chez ces patients, et nécessitent une prise en charge spécifique (psychothérapie, traitement psychotrope).

La corticothérapie n'est pas recommandée dans le traitement de la FPI, elle ne présente pas de bénéfice sur la survie et engendre des effets secondaires. L'étude PANTHER-IPF qui est en cours, a dû être interrompu prématurément dans le bras traité par l'association de **corticoïde** « Prednisone » + **immunosupresseur** « Azathioprine » + **antioxydant** «N-acetylcystéine », au vu de la surmortalité. Le premier et troisième bras sont toujours actifs et comprennent respectivement le Placebo et la N-acétylcystéine seule (Raghu, Anstrom et al. 2012).

2) Le traitement des complications

Parmi les nombreuses complications, on retrouve notamment les **exacerbations aiguës**, qui semblent elles mêmes liées aux **infections virales** et au **reflux-gastro-œsophagien**. **L'hypertension pulmonaire (HTP) constitue une complications fréquente, constituant un facteur de surmortalité indépendant.** Il n'est d'ailleurs pas encore bien établi, si ces affections, représentent des causes ou bien des conséquences de la FPI et/ou de son traitement.

(a) Les exacerbations aiguës

Les exacerbations aiguës peuvent être considérées comme une complication, bien qu'on ignore encore leur cause exacte. Des études montrent que lors d'épisodes d'exacerbation aiguë, les poumons des patients présentent un phénotype prothrombotique, avec formation d'une neo-intima abondante et de lésions endothéliales (Walter, Collard et al. 2006 ; Collard, Calfee et al. 2010). En accord avec ces observations, une augmentation des décès suite à des épisodes thromboemboliques a été observée chez les patients atteints de FPI (Panos, Mortenson et al. 1990). Cependant, les traitements anti-coagulants (Héparine ou Warfarine) combinés aux corticoïdes a été suspendu lors d'essais cliniques de phase III (ACE-IPF), suite à un excès d'effets secondaires et une augmentation de la mortalité comparé au contrôles placebo (Noth, Anstrom et al. 2012).

(b) Les infections virales

L'impact potentiel de certaines infections virales chez les patients atteints de FPI, fait l'objet de controverses. En effet certains pensent que c'est une cause de progression de la maladie, en représentant une source d'agression épithéliale, alors que d'autres pensent que c'est une conséquence, due au terrain vulnérable en lien avec la fibrose mais aussi du traitement à base d'immunosuppresseurs qui augmentent la vulnérabilité des patients à différentes infections. Dans les deux cas, un traitement antiviral ou bien une prévention par la vaccination (lorsque elle existe) permettrait d'éviter les exacerbations aiguës, qui pourrait être liés à une infection virale (Vannella, Luckhardt et al. 2010). Différents virus ont été impliqués, incluant le virus d'Epstein Barr (EBV), l'hépatite C, le virus de l'herpès, le cytomégalovirus (CMV) et le parvovirus. Les thérapies antivirales notamment l'utilisation de ganciclovir (anti-virus herpétiques) (Egan, Adamali et al. 2011), semble améliorer les symptômes, mais nécessite des études randomisées pour apprécier ou non son efficacité.

(c) Le reflux gastro-œsophagien (RGO)

La présence de RGO chez les patients atteints de FPI est documentée dans de nombreuses études (voir paragraphe X). Dans 50% des cas, les patients sont asymptomatiques, et ne reçoivent donc pas de traitement spécifique (Tobin, Pope et al. 1998 ; Raghu, Freudenberg et al. 2006). De manière intéressante, des études rétrospectives montrent que le traitement du RGO diminue les lésions observés par TDM (Tomodensitométrie), stabilise les fonctions pulmonaires et améliore la survie des patients (Linden, Gilbert et al. 2006; Raghu, Yang et al. 2006 ; Lee, Ryu et al. 2011). Une étude prospective est cependant nécessaire pour valider ces résultats (Tcherakian, Cottin et al. 2011).

(d) L'hypertension artérielle pulmonaire

On ignore si la présence d'une hypertension pulmonaire constitue un phénotype particulier de PFI, ou s'il s'agit d'une complication de l'hypoxie chronique. Les patients présentant une HTP présentent une altération clinique et fonctionnelle plus sévère ainsi qu'une survie diminuée. Une étude récente (STEP-IPF) testant le sildénafil (inhibiteur de la PDE5) montre une amélioration fonctionnelle chez des patients FPI présentant une HTP avec dysfonction du ventricule droit (Han, Bach et al. 2013).

3) Traitement antifibrotique, la Pirfenidone

La (5-méthyl-1-phenyl-2-[1H]-pyridone), est une molécule pléiotropique qui a des propriétés antifibrotiques, anti-inflammatoires et antioxydantes (Maher 2010). Des études *in*

vitro et *in vivo*, montrent que la pirfenidone atténue les médiateurs profibrotiques, et diminue les marqueurs de prolifération cellulaire en réponse aux facteurs de croissance TGF- β et PDGF (Gurujeyalakshmi, Hollinger et al. 1999 ; Iyer, Gurujeyalakshmi et al. 1999). Trois études de phase III, multicentriques, randomisées, en double aveugle et contrôlées contre placebo, ont permis d'évaluer l'efficacité clinique et la tolérance de la pirfenidone chez des patients présentant une FPI (Taniguchi, Ebina et al. 2010 ; Noble, Albera et al. 2011).

La Pirfenidone (ESBRIET[®]) a obtenu une autorisation de mise sur le marché (AMM) depuis le 28 février 2011 en France dans les formes légères à modérées. Elle permet de prolonger la survie sans progression de 26% vs placebo dans un sous groupe de patients et au prix d'effets indésirables fréquents. Un nouvel essai clinique de phase III est en cours (essai ASCEND) au Etats-Unis, en Australie et en Nouvelle Zélande afin de valider son efficacité. Cependant, les mécanismes de fonctionnement de cette molécule ne sont pas connus et la balance bénéfices-risques n'est pas favorable. Parmi les effets secondaires constatés, on retrouve des manifestations cutanées ainsi que des troubles cardiaques et digestifs (Raghu and Thickett 2013).

4) N-acetylcysteine

La perturbation de la balance oxydants/antioxydants a été démontrée dans la pathologie (Hunninghake 2005). Les patients sont ainsi déficients pour les antioxydants comme le glutathion et les protéines superoxyde dismutase (Cantin, Hubbard et al. 1989). La N-acetylcysteine (NAC), est un tripeptide (γ -glutamyl-cysteinyl-glycine) précurseur du glutathion, et va ainsi diminuer le taux de radicaux libres d'oxygène (Gillissen and Nowak 1998). D'une manière intéressante la NAC peut directement altérer la structure du TGF- β , et ainsi atténuer ses propriétés profibrotiques (Zafarullah, Li et al. 2003). Son utilisation est en cours d'évaluation dans le troisième bras de l'étude PANTHER-IPF (Raghu, Anstrom et al. 2012).

5) La transplantation pulmonaire

La transplantation pulmonaire reste à l'heure actuelle le seul traitement qui a montré une augmentation significative de la survie des patients. Trois types de greffes peuvent être réalisés : la greffe monopulmonaire où un seul poumon est remplacé, la greffe bipulmonaire, c'est à dire l'ensemble des deux poumons avec la vascularisation, et enfin la greffe de l'ensemble cœur-poumons.

La greffe améliore la qualité de vie des patients, ainsi que leur survie. Cependant cette option présente beaucoup de limites. D'une part, la disponibilité des transplants reste limitée.

D'autre part, les risques de rejet de greffe sont élevés, nécessitant une prise d'immunosuppresseurs à vie exposant à des complications toxiques et infectieuses.

6) De nouvelles approches thérapeutiques

Une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la pathogenèse de la FPI a permis de réaliser des progrès considérables dans la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques au cours de ces dix dernières années.

(a) Les inhibiteurs des récepteurs tyrosines kinase (RTKs)

Un inhibiteur du récepteur du PDGF (Imanitib mesylate) développé initialement pour lutter contre la leucémie, a montré des effets encourageants dans les modèles murins de fibrose (Daniels, Wilkes et al. 2004 ; Vuorinen, Gao et al. 2007). Néanmoins, aucun effet bénéfique n'a été constaté lors d'essais cliniques de phase II (Daniels, Lasky et al. 2010).

Plus récemment, le BIBF 1120, un inhibiteur des récepteurs aux PDGF, du VEGF, et du FGF administré *in vivo* protège contre le développement de la fibrose induite par bleomycine (Chaudhary, Roth et al. 2007). L'essai clinique TOMORROW en phase II, a montré que l'une des doses les plus élevées améliorait la qualité de vie des patients et diminuait les phases d'exacerbations aiguës. Les essais cliniques de phases III sont en cours (NCT 01335464 et NCT01335477) (Antoniou 2012).

(b) Anti IL-13

L'IL-13, comme décrit précédemment possède une activité pro-fibrotique en augmentant notamment l'expression du TGF- β , du PDGF, du CTGF, du collagène I et de la fibronectine (Zhu, Homer et al. 1999). L'administration *in vivo* d'un anticorps anti IL-13 atténue la fibrose pulmonaire induite par bléomycine chez la souris (Belperio, Dy et al. 2002). L'anticorps humanisé QAX576 est en essai clinique randomisé en double aveugle comparé à un contrôle placebo (NCT01266135).

(c) Anti-CCL2

Connue aussi sous le nom de MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1), cette chimiokine joue un rôle important dans le chimiotactisme des monocytes basophiles, lymphocytes T (Rose, Sung et al. 2003) et fibrocytes (Moore, Kolodnick et al. 2005) en activant l'expression du TGF- β (Gharraee-Kermani, McCullumsmith et al. 2003). Son expression est élevée chez les patients atteints de FPI (Baran, Opalek et al. 2007). De plus, son inhibition *in vivo* protège les souris du développement de fibrose pulmonaire (Moore, Paine et al. 2001). L'utilisation d'un

anticorps humanisé anti-CCL2 CNTO-888, est en phase clinique II en double aveugle randomisé comparé à un placebo (NCT00786201).

(d) Anti-TGF- β

Le TGF- β est la cytokine profibrotique par excellence, inhiber son expression pourrait donc atténuer la fibrose (Bartram and Speer 2004). Cependant, le TGF- β joue un rôle important dans différents processus physiologique incluant la régulation de la réponse inflammatoire. L'inhibition complète du TGF- β pourrait ainsi induire comme chez la souris; une forte inflammation et un décès précoce (Kulkarni, Huh et al. 1993). Des stratégies qui permettent d'inhiber indirectement l'expression du TGF- β semblent intéressantes, notamment en ciblant l'intégrine $\alpha\beta 6$ présente en grande quantité dans les poumons de patient atteints de FPI (Horan, Wood et al. 2008). En effet, cette protéine permet d'activer le TGF- β initialement secrété sous forme d'un complexe latent. Dans les modèles murins, l'utilisation d'un anticorps anti- $\alpha\beta 6$ (STX-100) a montré des résultats encourageants. Un essai clinique randomisé en double aveugle contrôle placebo, est en cours (NCT 01371035).

(e) Anti-Lysyl oxydase (LOXL2)

Les Lysyl oxydases, sont un groupe d'enzymes qui catalysent la réticulation des fibres de collagène (Rucker and Murray 1978 ; Yamauchi and Shiiba 2008). Les patients atteints de FPI ont une expression élevée de LOXL2 dans les poumons (Barry-Hamilton, Spangler et al. 2010). D'autre part, une surexpression de LOXL2 accélère l'accumulation et le dépôt du collagène dans les fibroblastes les gliomes et cancer du sein (Akiri, Sabo et al. 2003 ; Barry-Hamilton, Spangler et al. 2010). L'utilisation d'un anticorps monoclonal dirigé contre LOXL2 dans le modèle de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine chez la souris, diminue significativement le taux d'expression de collagène, l'activation des fibroblastes et des cytokines inflammatoires. L'anticorps anti-LOXL2 humanisé (AB0024) est en en cours d'essai clinique (NCT01362231).

(f) Les microARN

Au moins deux tiers des gènes humains codant pour des protéines s'avèrent être régulés par les microARN (miARNs) (Lewis, Burge et al. 2005). Ces petites molécules d'ARN émergent donc comme des régulateurs majeurs de l'expression génique. Ils sont impliqués dans différents processus physiologiques tels que la différenciation, la prolifération et la réparation tissulaire (Lau, Lim et al. 2001). De plus, leurs dérégulation d'expression est constatée dans différentes pathologies, dont la FPI (Pandit, Milosevic et al. 2011). En effet,

les premières études fonctionnelles montrent qu'ils sont impliqués dans le contrôle de différents facteurs profibrotiques, à travers différentes boucles de régulation. De plus, ils sont facilement détectables et relativement faciles à manipuler, apparaissant ainsi comme des outils de diagnostic et/ou des cibles thérapeutiques particulièrement prometteuses (Galasso, Sana et al. 2010).

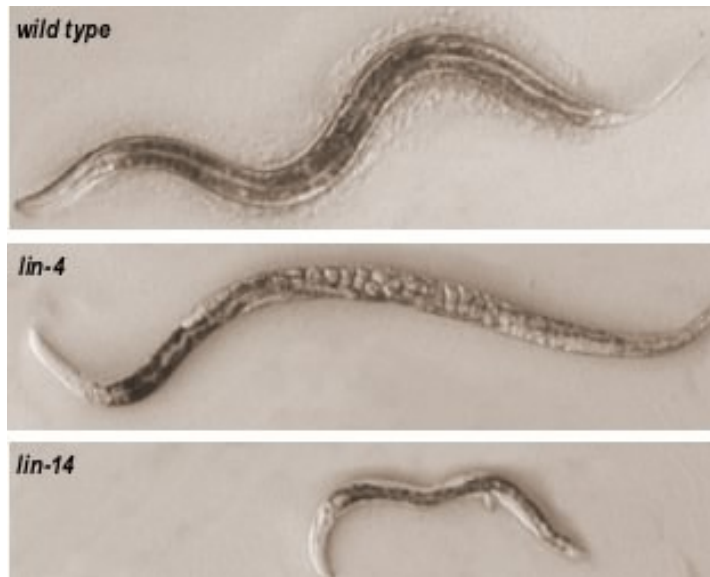


Figure 13 : Les phénotypes mutants pour *lin-4* et *lin-14* chez *C.elegans*. La mutation ***lin-4*** chez *C.elegans* induit au stade adulte différentes anomalies, à savoir une absence de vulve qui les rend inapte à pondre leurs œufs, provoquant ainsi leur accumulation dans leur corps. A contrario, la perte de fonction de ***lin-14*** induit au stade larvaire des caractéristiques adultes précoces conduisant à une diminution de leur taille au stade adulte (D'après Ambros, 2008)

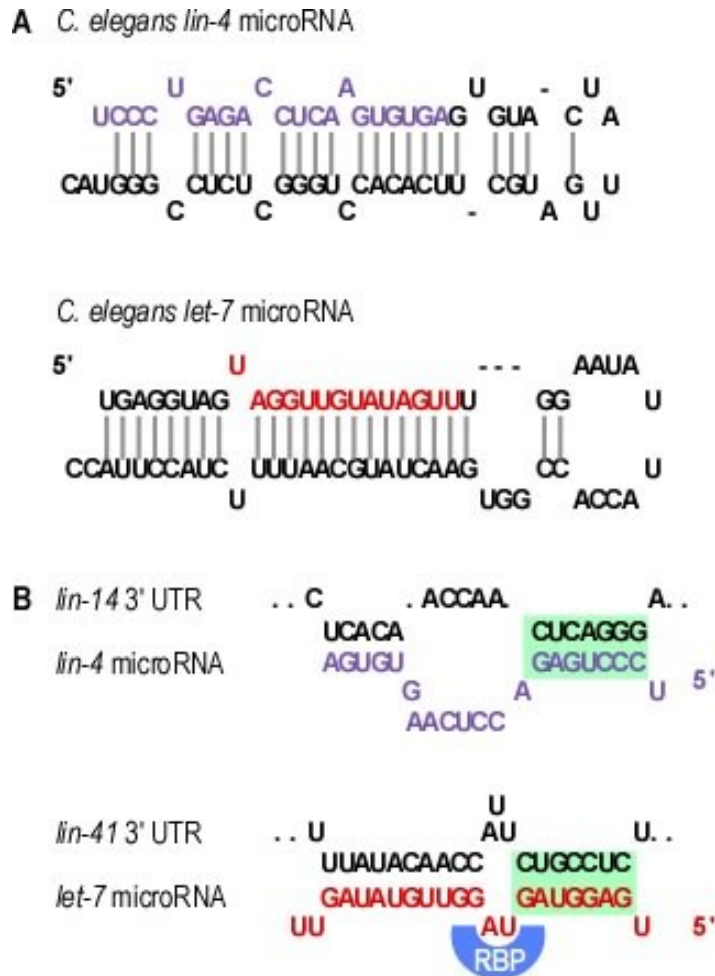


Figure 14 : Les miARN lin-4 et let-7. (a) Structure du pré-miARN lin-4 et sa séquence mature (bleu) ainsi que la structure du pré-miARN let-7 avec sa séquence mature (rouge). (b) Les séquences d'appariements avec les extrémités 3'UTRs de leurs cibles respectives lin-14 et lin-41; de droite à gauche : (i) la région "seed" (en vert), (ii) la boucle de la région non appariée qui peut être reconnue par la protéine RBP (RNA Binding Proteins), (iii) les appariements en 3' compensatoires (D'après Ambros, 2008)

Chapitre II: Les miARN

L'intérêt pour les microARN (miARN) a incroyablement augmenté au cours de ces dix dernières années et il est maintenant bien établi que ces petits ARN non codants représentent une partie fonctionnellement très importante de notre génome, en exerçant un rôle crucial dans la régulation de l'expression des gènes (Lagos-Quintana, Rauhut et al. 2001). En effet, ils sont impliqués dans la quasi-totalité des processus biologiques tels que le développement, la prolifération et la différenciation cellulaire (Ambros, Bartel et al. 2003). La dérégulation de leur expression peut être à l'origine, ou bien contribuer à un grand nombre de maladies, suscitant un intérêt croissant en médecine pour leur utilisation comme bio-marqueurs diagnostiques ou pronostiques, ou comme de nouvelles cibles thérapeutiques. L'effort de recherche a notamment porté sur des maladies pour lesquelles aucun traitement efficace n'existe encore, telles que les pathologies fibrotiques.

I) La découverte des miARN

En étudiant le développement larvaire chez *C. elegans*, deux gènes, *lin-4* et *lin-14* ont été identifiés et décrits comme essentiels au contrôle temporel du développement larvaire (**figure 13**) (Ambros 1989 ; Ruvkun and Giusto 1989). Les mutants *lin-4* et *lin-14* étaient opposés d'un point de vue phénotypique, ce qui permit à Victor Ambros d'émettre l'hypothèse que *lin-4* pouvait être responsable de l'inhibition de *lin-14* (Ambros 1989). Cette hypothèse fut validée quatre ans plus tard en 1993 et le premier miARN « *lin-4* » fut décrit de manière simultanée par les deux équipes d'Ambros et Ruvkun (Lee, Feinbaum et al. 1993 ; Wightman, Ha et al. 1993). L'équipe d'Ambros a pu montrer que le gène *lin-4* n'induisait pas l'expression d'une protéine, mais d'un ARN de 61 nucléotides sous forme « d'épingle à cheveux », et d'un petit ARN de 22 nucléotides représentant le miARN mature « *lin-4* ». Ils découvrent aussi que l'extrémité 5' de la séquence du petit ARN « d'environ 7 nucléotides » est complémentaire à la région 3'UTR de l'ARNm *lin-14* (**figure 14**) (Lee, Feinbaum et al. 1993 ; Wightman, Ha et al. 1993). Par la suite, l'interaction directe de *let-7* sur la région 3'UTR de l'ARNm *lin-14* a été décrite comme responsable de l'inhibition de la traduction de *lin-14*, diminuant ainsi le niveau d'expression de la protéine induite, sans modifier le niveau d'expression de l'ARNm *lin-14* (Ha, Wightman et al. 1996 ; Olsen and Ambros 1999). Entre 1993 et 2000, quelques découvertes montrent que l'interaction entre *lin-4* et *lin-14*, et la régulation de gène qui en découle n'est pas un cas unique. En effet, *lin-4* inhibe de la même façon la traduction de la protéine *lin-28*, mais avec un appariement impliquant des séquences différentes (Moss, Lee et al. 1997). En parallèle, un autre phénomène impliquant des ARNs, est découvert avec l'ARN

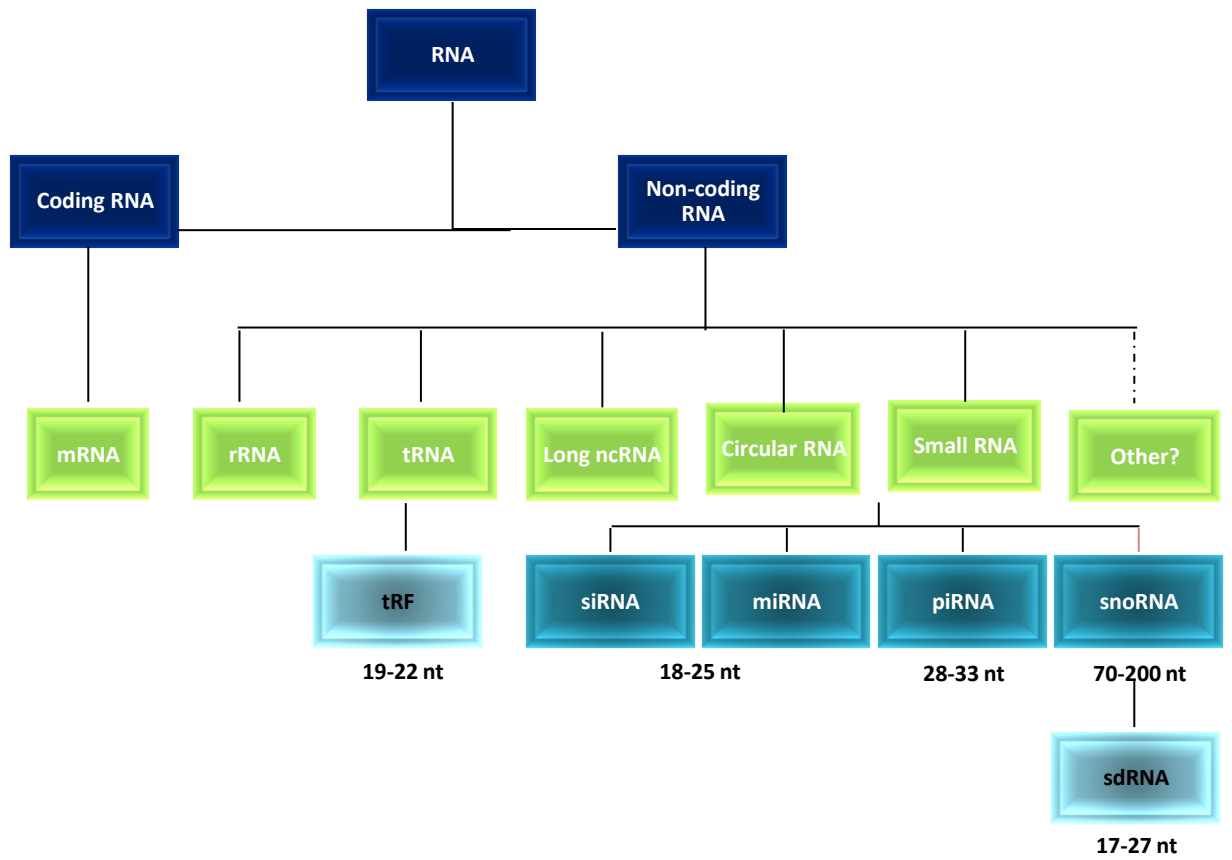


Figure 15 : Les différentes classes d'ARN

interférence chez les plantes (Fire, Xu et al. 1998 ; Hamilton and Baulcombe 1999). Ce n'est que plus tard en 2000, que Ruvkun et ses collaborateurs découvrent un second miARN chez *c.elegans*, *let-7* qui inhibe l'expression de la protéine Lin-41 (Reinhart, Slack et al. 2000). Contrairement à *lin-4* (miR-125 chez les mammifères), la conservation phylogénétique de *let-7* a été découverte rapidement dans d'autres espèces y compris les mammifères, avec une fonction conservée dans la coordination temporelle du développement (Pasquinelli, Reinhart et al. 2000). En 2001, les miARN sont établis comme une nouvelle classe de régulateurs de gènes conservés à travers les espèces (Lagos-Quintana, Rauhut et al. 2001 ; Lau, Lim et al. 2001 ; Lee and Ambros 2001). On compte aujourd'hui 2578 miARN matures annotés chez l'homme, d'après la base de données **miRbase** version 20 de juin 2013 (Griffiths-Jones, Grocock et al. 2006). La découverte des miARN comme de nouveaux régulateurs endogènes de l'expression génique, a permis de remettre en cause le dogme central de la biologie moléculaire, en ouvrant la voie à d'autres régulateurs de gènes de type ARN non codants (**figure 15**) (Ambros 2008 ; Farazi, Juranek et al. 2008).

II) La découverte de l'interférence ARN (i-ARN)

Connu chez les plantes sous le nom de PTGS « post-transcriptional gene silencing » (Hamilton and Baulcombe 1999), chez les champignons « quelling » (Romano and Macino 1992) et chez les mammifères **interférence à l'ARN** (Elbashir, Harborth et al. 2001), ce mécanisme a été découvert avant les miARN de manière tout à fait fortuite en 1990. En effet, en voulant accentuer la couleur mauve des *petunia*, en introduisant un gène synthétique de la chalcone synthase (CHS), les chercheurs constatent de manière inattendue, que la fleur devient blanche, avec une diminution d'expression de l'ARNm de la CHS. Ce phénomène fut appelé à l'époque « cosuppression » (Napoli, Lemieux et al. 1990 ; van der Krol, Mur et al. 1990). Plus tard, ce phénomène est mis en évidence en tant qu'interférence ARN (i-RNA) chez *c.elegans*, lorsqu'une introduction d'ARN double brin homologue du gène d'intérêt induit efficacement sa diminution d'expression et perdure pendant plusieurs générations (Fire, Xu et al. 1998). Le mécanisme d'i-ARN est ensuite rapidement testé chez la drosophile (Kennerdell and Carthew 1998) et semble être un outil efficace pour induire des phénotypes mutants. Ce mécanisme est accompagné de l'apparition de petits ARN antisens dont la taille varie entre 20 et 25 nucléotides, de complémentarité parfaite à la séquence du gène cible (Hamilton and Baulcombe 1999). C'est plus tard que les intermédiaires de l'i-ARN ont été découverts, sous le nom de siARN « short interfering RNAs » (Elbashir, Harborth et al. 2001). Elbashir et ses collaborateurs, ont pu montrer que des fragments d'ARN double brins

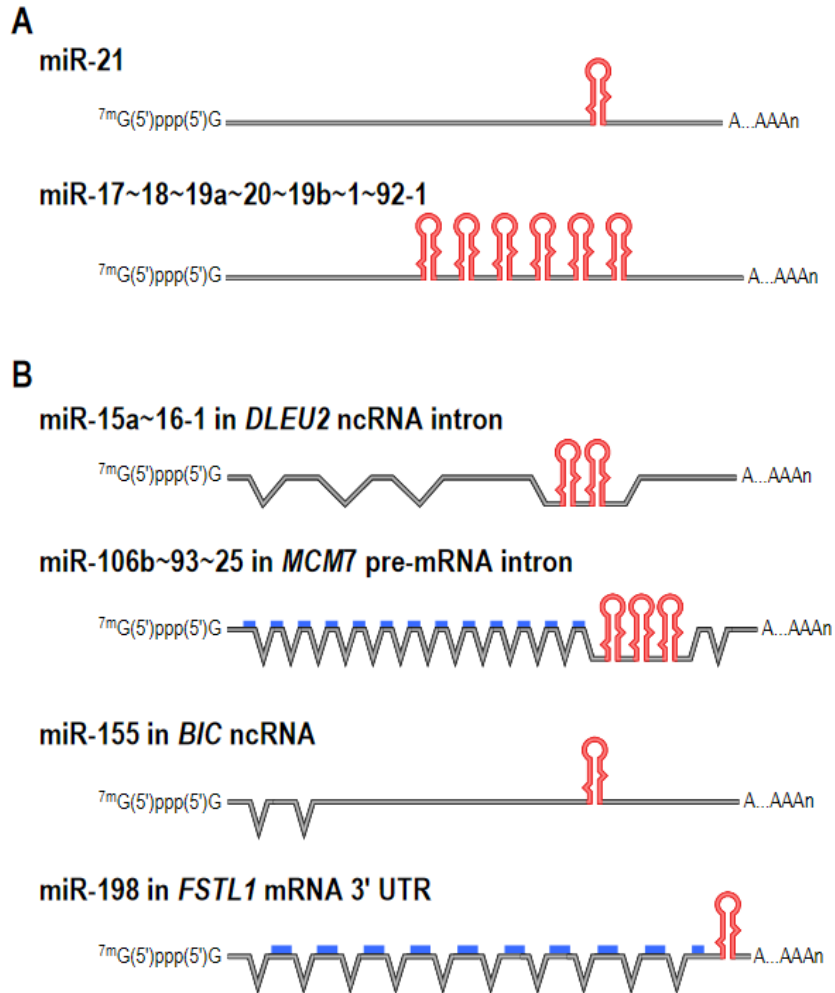


Figure 16 : La structure de certains pri-miARN humains. (a) Exemples de miARN avec leurs propres unités de transcription : miR-21 et le cluster polycistronique miR-17-92-1. **(b)** Exemple de miARN transcrits avec d'autres gènes. miR-15a ~ 16-1 se localise dans l'intron d'un ARN non codant (Dleu2) et miR-106b ~ 93 ~ 25 se localise dans l'intron d'un ARN codant pour une protéine (MCM7). miR-155 se trouve dans l'exon d'un ARN non codant (BIC), alors que miR-198 est dans l'exon d'un ARNm codant pour une protéine (FSTL1). DLEU2 (Deleted in Lymphocytic Leukemia 2) ; MCM7, (Minichromosome Maintenance Deficient 7) ; BIC (B-cell Integration Cluster) ; FSTL1 (Follistatin-Like 1) (D'après Zamore, 2005)

synthétiques, comportant des extrémités 3' sortantes de 2 nucléotides, suffisaient à éteindre de manière spécifique l'expression de gènes à l'aide d'essais luciférase *in vitro*. La découverte de l'i-ARN par Andrew Fire et Craig Mello leur a valu le prix Nobel de physiologie et de médecine en 2006.

Malgré certaines différences, de grandes similitudes lient les siARN aux miARN. En effet, ils sont de taille équivalente suite à la maturation induite par la nucléase Dicer, et diminuent l'expression des gènes en s'associant aux protéines de la famille Argonaute (en particulier, Ago-2 chez les mammifères). Les si-ARN s'apparient de façon parfaitement complémentaire à l'ARNm cible, permettant ainsi à l'endonucléase Ago-2 de dégrader l'ARNm cible (le cas également pour les miARN chez la plante). Chez les mammifères, la reconnaissance entre un miARN et sa cible est principalement contrôlée par une séquence d'environ 7 bases, située dans partie 5' du miARN (séquence de reconnaissance ou « seed »), et chaque miARN aurait donc la capacité de réguler la stabilité d'un large spectre d'ARNm distincts (Zamore and Haley 2005).

III) Présentation générale des miARN

Les miARN constituent avec les si-ARN et les piARN (piwi interacting RNA), la famille des petits ARN non codants, dont la taille varie entre 20 et 30 nucléotides. Les miARN ainsi que les siARN, s'associent aux protéines Argonautes « Ago » pour exercer leurs fonctions, alors que les piARN, se lient à la protéine Argonaute « Piwi », jouant un rôle de contrôle des éléments transposables dans les cellules germinales. Le dogme central propose que ces mécanismes de contrôle post-transcriptionnel, très répandus chez les plantes, ont été probablement sélectionnés au cours de l'évolution, afin de protéger les cellules contre l'introduction de gènes, en particulier les virus à ARN, mais aussi pour nettoyer la cellule des ARNm non fonctionnels (Vaucheret, Beclin et al. 2001).

Les miARN ne sont exprimés que chez les eucaryotes, malgré quelques exceptions chez certaines espèces de bactéries. Ils jouent un rôle important dans la régulation de l'expression des gènes. De manière générale, ils agissent principalement sur deux niveaux de régulation : (i) **au niveau traductionnel**, en inhibant l'efficacité de la machinerie traductionnelle ; (ii) au niveau **post- transcriptionnel**, en déstabilisant l'ARNm cible et en induisant sa dégradation.

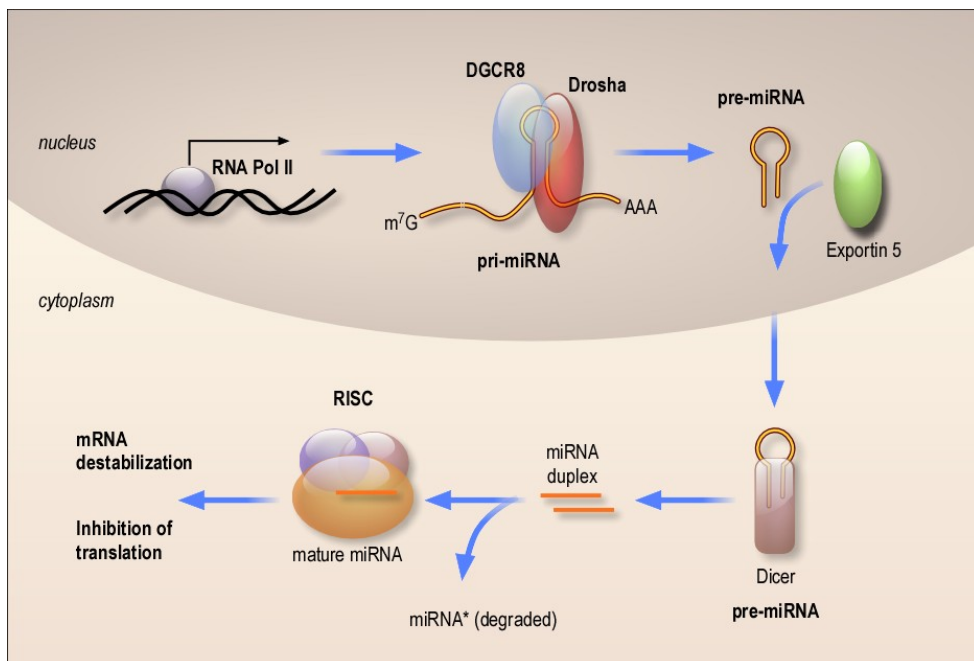


Figure 17 : Biogenèse des miARN (D'après Blahana, 2013)

1) Organisation génomique des miRNA

Selon leur localisation génomique, les miARN peuvent être séparés en deux groupes, (i) les miARN « inter-géniques », possédant leur propre unité de transcription ; (ii) les miARN introniques, co-transcrits avec leurs gènes hôtes (**figure 16**).

On retrouve environ 40% des miARN dans des gènes qui codent pour des protéines, la majorité étant localisée dans des régions introniques et co-transcrits avec leurs gènes hôtes (Baskerville and Bartel 2005). Cependant, un tiers de ces miARN peuvent sous certaines conditions être transcrits à partir d'un promoteur indépendant du gène hôte, comme par exemple le cluster miR-1-1 et miR-133-a2 (Ozsolak, Poling et al. 2008 ; Monteys, Spengler et al. 2010).

D'autres miARN sont localisés dans des régions dites « intergéniques », comme par exemple miR-155 dans l'exon du gène non-codant BIC ou miR-210 dans le transcrit régulé lors de l'hypoxie AK123483. D'autre part, il a été constaté que chez les mammifères, un tiers des miARN sont transcrits sous forme de polycistrons, présents sur un seul transcrit primaire (Zhao and Srivastava 2007). Les miARN sont transcrits par l'ARN polymérase II (Pol II), sous la forme d'un long transcrit primaire (pri-miARN), avec une coiffe M7G en 5', et polyadénylés en 3', majoritairement sous le contrôle de promoteurs tissus spécifiques (Saini, Griffiths-Jones et al. 2007). Ainsi, les expériences d'immunoprécipitation de chromatine liée à la Pol II par microarrays (ChIP-on-chip) (Corcoran, Pandit et al. 2009) et PCR-quantitative (ChIP-qPCR) (Ozsolak, Poling et al. 2008) confirment que les promoteurs de miARN sont semblables à ceux qui régulent l'expression des gènes codants.

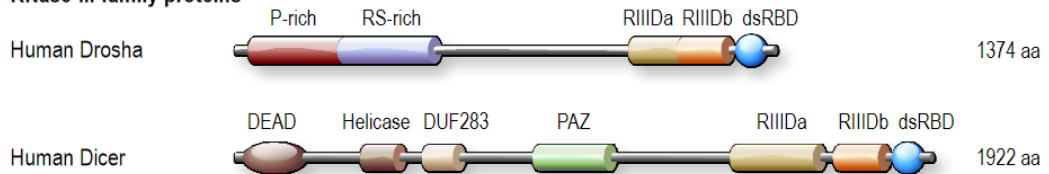
2) Biogenèse et maturation des miARN

Chez les mammifères, il existe différentes voies alternatives de biogenèse des miARN, ce qui reflète une grande flexibilité en terme d'évolution et d'adaptabilité à différentes sources d'ARN double brin (Yang and Lai 2011).

(a) Voie canonique de maturation des miARN

La voie canonique de maturation des miARN se caractérise par deux clivages successifs du transcrit primaire « pri-miARN » (**Figure 17**). Le premier clivage est assuré par un complexe protéique appelé « microprocesseur » dont le cœur se compose d'une endonucléase de type RNase III « Drosha » (**figure 18A**), associée à la protéine de liaison aux ARN double brin DGCR8 « Pasha » (**figure 18B**), qui va permettre par son positionnement précis sur le pri-miARN de diriger le clivage de Drosha au niveau de la 11^{ème} base à partir de la base de la structure en « tige-boucle » (Ghildiyal and Zamore 2009).

A RNase-III-family proteins



B dsRNA-binding proteins



C Export receptor



Figure 18 : Les différents acteurs impliqués dans les processus de maturation des miARN. (A) Le domaine RNase III (RIIID, en orange) est le domaine catalytique qui est responsable de la réaction endonucléolytique des enzymes RNase III comme Dicer et Drosha. Le domaine dsRBD (en bleu) est le domaine de liaison à l'ARN double brin. La fonction biologique de la région riche en proline (P-riche, en bordeaux) est inconnue. La région RS-riche (en mauve) est riche en arginine et résidus sérines, sa fonction est également inconnue. Toutefois, l'extrémité C-terminale de cette région s'avère importante pour l'activité de Drosha. Le domaine PAZ (en vert) se lie à l'extrémité 3' du miARN. Le domaine ARN hélicase (DEAD-box) est typique des enzymes qui hydrolysent l'ATP et facilite la fixation avec le duplex ARN. Le domaine DUF283 n'a pas de fonction connue. (B) Le motif WW de la protéine DGCR8 sert à l'interaction avec d'autres protéines en se liant au domaine « P-riche ». (C) Le domaine des récepteurs de transport nucléaire (NTR) se trouve dans un grand nombre de protéines de transport nucléaire tel que l'exportine 5 qui est dépendante de la petite protéine G « Ran » (D'après Narry Kim, 2005)

Ce complexe Drosha/Pasha peut interagir avec deux protéines de la famille des « DEAD-box helicase protein », p68 appelée aussi DDX5, ainsi que p72 (DDX17) intervenant dans la maturation de certains miARN, bien que le mécanisme exact ne soit pas encore bien caractérisé. La maturation de certains miARN nécessite la présence de p72 uniquement alors que pour d'autres elle requiert p68, suggérant une complexité structurale importante au niveau du microprocesseur (Fukuda, Yamagata et al. 2007). L'excision provoquée par le microprocesseur permet le recrutement d'exonucléases 5'-3' et 3'-5', entraînant la dégradation des séquences flanquantes. Ce premier clivage va générer un « pré-miARN » d'environ 70 nucléotides, et va pouvoir être exporté vers le cytoplasme par le complexe Exportine 5 (EXP5)-RanGTP (**figure 18C**).

C'est au niveau du cytoplasme que le second clivage a lieu, par une autre RNase de type III; Dicer, associée avec plusieurs cofacteurs, notamment TRBP « TAR RNA Binding Protein ». Ce dernier clivage génère un duplex de miARN, dont la longueur est de 22 nucléotides environ. Le duplex est composé d'un miARN mature dit « brin guide » car il permet de guider la répression vers les ARN messagers cibles, et d'un second miARN dit brin « passager » ou encore « star », qui va être exclu du complexe RISC puis dégradé. Cependant, le brin « star » peut aussi être recruté par le complexe RISC et cela pourrait dépendre de la stabilité d'appariement du complexe au niveau 5' : plus elle est faible thermodynamiquement, plus le brin est majoritairement incorporé (Schwarz, Hutvagner et al. 2003 ; Preall, He et al. 2006). La nouvelle nomenclature de miRbase recommande donc maintenant le terme de « 3-p » ou « 5-p » en fonction de l'extrémité du miARN au sein du pré-miARN, puisqu'on trouve pour la plupart des miARN la séquence des 2 brins dans les bases de données de séquençage.

(b) Les voies alternatives de maturation des miARN

Il existe différentes voies alternatives décrites dans la littérature qui contribuent à la maturation des miARN, parmi elles deux voies majeures :

- Maturation indépendante de Drosha/DGCR8

Le séquençage du génome de la drosophile a révélé l'existence de petites séquences d'ARN double brin qui correspondent à des séquences d'ARN introniques structurées en tige-boucle nommées « mirtrons », pour lesquelles les extrémités 5' ou 3' du petit ARN mature coïncident avec des sites d'épissage (Okamura, Hagen et al. 2007 ; Ruby, Jan et al. 2007), ce qui ne nécessite plus l'intervention de Drosha/DGCR8. Ce type de miARN intronique a par la suite été découvert chez plusieurs espèces de vertébrés (Yang and Lai 2011).

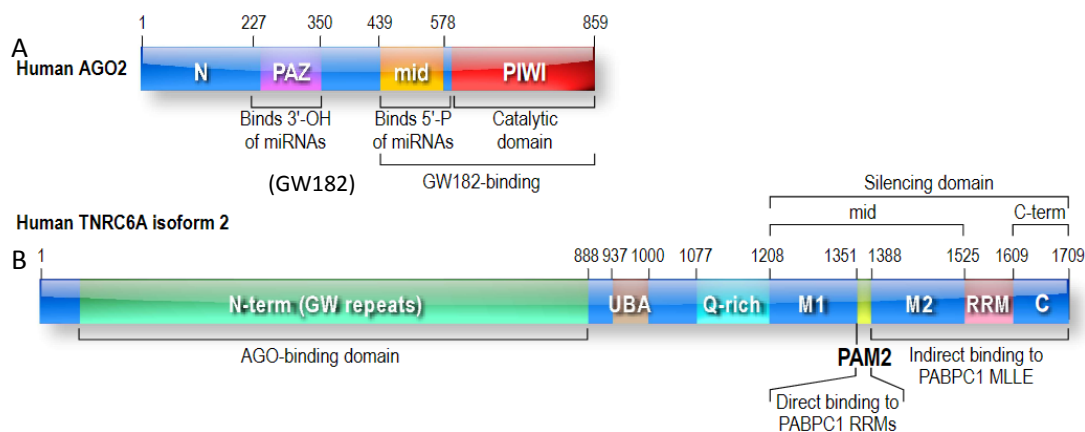


Figure 19 : Protéines impliquées dans la répression de gènes par les miARN. (A) La protéine Ago2 est représentée comme un exemple de la famille Argonaute, elle se compose de quatre domaines : le domaine N-terminal, le domaine PAZ qui lie l'extrémité 3' des miARN, le domaine « mid » qui est structuré en poche de liaison pour le 5'- phosphate du miARN, et le domaine catalytique PIWI qui fonctionne comme une RNase-H et possède une activité endonucléolytique dans Ago2. Le domaine mid et PIWI interagissent avec la protéine GW182. (B) La protéine TNRC6A est représentée comme un exemple parmi les membres de la famille des protéines GW182. Les protéines GW182 contiennent deux domaines globulaires : un domaine (UBA) (ubiquitin-associated-like domain) et un motif de reconnaissance d'ARN (RRM). Ces domaines sont intégrés de manière non structurée dans les régions N-terminales (mid) et C-terminal, avec un nombre variable de répétitions glycine - tryptophane (GW). La plupart des répétitions sont situées dans la région N - terminale, qui augmente l'affinité de liaison aux protéines Ago. Le domaine mid est divisé en deux zones M1 et M2 séparées par un motif PAM2. La protéine GW182 contient aussi une région riche en glutamine « Q- rich ».

- Maturation indépendante de Dicer

Plusieurs équipes ont montré une maturation indépendante de Dicer pour le miARN miR-451 (Cheloufi, Dos Santos et al. 2010 ; Cifuentes, Xue et al. 2010 ; Yang, Maurin et al. 2010). L'examen de la structure du précurseur de miR-451 et de son miARN mature a révélé une caractéristique inhabituelle. Les six derniers nucléotides du miR-451 mature se prolongent tout au long de la tige boucle et s'étendent jusqu'au brin complémentaire, ce qui donne naissance à un miARN mature unique sans brin passager (Cheloufi, Dos Santos et al. 2010). Ces équipes ont montré que la structure du pré-miR-451 de 18 paires de bases était trop courte pour être prise en charge par Dicer (Siolas, Lerner et al. 2005), ce dernier étant pris en charge directement par Ago2 qui va cliver le pré-miR sur le bras 3' de la tige boucle, donnant naissance à un miARN mature unique (Yang and Lai 2011).

IV) Mécanismes d'action des miARN

1) Le complexe RISC (RNA induced Silencing complex)

Suite au clivage induit par l'enzyme Dicer, le duplex miARN se dissocie, et le miARN mature est pris en charge par une protéine Ago (**figure 19A**). Le miARN mature sert de guide en s'appariant aux gènes cibles. Le complexe RISC est un complexe moléculaire hétérogène programmé pour éteindre l'expression de gènes cibles par divers mécanismes, soit en dégradant l'ARNm, soit en réprimant sa traduction. Ce complexe protéique peut s'associer aussi bien aux miARN (miRISC) qu'aux siARN (siRISC). Il est composé des protéines Ago et de protéines GW182 (nommées GW car elles contiennent dans leur domaine N-terminal des motifs répétés de glycine et de tryptophane, nécessaires pour interagir avec les protéines Ago). Il existe quatre protéines Argonaute chez les mammifères (Ago1-4). La protéine Ago2 s'associe à la fois aux miARN mais aussi aux siARN, Ago2 étant la seule à posséder une activité endonucléase de type « slicer ». Les autres protéines Ago semblent avoir uniquement un rôle dans la voie des miARN. Elles possèdent trois domaines conservés : (i) le domaine PAZ (Piwi-Argonaute-Zwille) partagé aussi avec Dicer, permet de reconnaître l'extrémité 3' sortante du miARN guide, (ii) le domaine Mid permet de renfermer et fixer la partie 5' du miARN guide, (iii) et le domaine PIWI dont la conformation secondaire est similaire à une RNase H, et qui contient le domaine catalytique d'Ago2. Une fois le miARN guide associé à la protéine Ago, le complexe va recruter les protéines GW182 (TNRC6A, B et C) (**figure 19B**) (Eulalio, Helms et al. 2009). La région C-terminale de GW182 est impliquée dans la répression traductionnelle ou bien la dégradation de l'ARNm cible (Hutvagner and Simard 2008 ; Gu and Kay 2010) *via* le recrutement de différents facteurs.

2) Les mécanismes de répression d'expression des cibles de miARN

Les travaux sur le mécanisme d'action de lin-4 indiquaient que les miARN régulaient le niveau d'expression de leurs gènes cibles en jouant uniquement sur la traduction de la protéine sans affecter le niveau d'expression de l'ARNm. Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer cette inhibition de la traduction, blocage de l'initiation de la traduction (Pillai, Bhattacharyya et al. 2005) ou d'étapes plus tardives (Petersen, Bordeleau et al. 2006). Cependant, d'autres études, notamment celles ayant analysé les conséquences de la surexpression de miARN sur l'ensemble du transcriptome cellulaire, ont permis de mettre en évidence une diminution importante des niveaux d'ARNm cibles (Olsen and Ambros 1999 ; Lim, Lau et al. 2005).

Les mécanismes exacts sont donc sujet aux controverses, et les approches globales de protéomiques et transcriptomiques indiquent que la diminution d'abondance de plusieurs ARNm réprimés par un miARN concorde avec une diminution de l'expression protéique (Baek, Villen et al. 2008 ; Hendrickson, Hogan et al. 2009). Ce qui laisse à penser que les deux événements pourrait être liés, et que l'utilisation de stratégies expérimentales différentes sont peut être la cause des contradictions au sujet du mécanisme d'action des miARN (Djuranovic, Nahvi et al. 2012). A ce jour, nous ne savons donc pas encore si les différents mécanismes d'inhibition proposés peuvent être généralisés, ou s'ils sont dépendants de différents facteurs cellulaires ou expérimentaux.

(a) L'inhibition de la traduction

La machinerie traductionnelle débute par la reconnaissance de la coiffe m7G au niveau de l'extrémité 5' de l'ARNm, par le complexe d'initiation de la traduction eIF4F (eukaryotic Initiation Factors 4F). Ce complexe est composé d'une protéine de liaison à la coiffe eIF4E, une protéine d'échafaudage EIF4G et une hélicase ARN dépendante eIF4A. L'initiation de la traduction au niveau de la coiffe commence par l'interaction entre eIF3 et eIF4G et le recrutement de la sous unité ribosomique 40S. Au niveau de la queue poly A, se lie une PABP (poly A binding protein) qui va interagir avec eIF4G permettant ainsi le rapprochement des deux extrémités en formant un ARNm circulaire prêt à commencer le reste des étapes de traduction en étant protégé de la dégradation (Jackson, Hellen et al. 2010) .

- L'inhibition de l'initiation de la traduction

Plusieurs études montrent que les miARN inhibent l'initiation de la traduction, avant et après la mise en place du complexe d'initiation de la traduction. La liaison du miARN avec l'ARNm cible peut affecter la traduction en empêchant la liaison avec les polysomes. En

effet, les analyses de purification de polysomes sur gradient de sucrose révèlent que les miARN et leurs cibles ont une densité plus faible suggérant que les ARNm en cours d'inhibition lient peu de protéines ribosomiques (Olsen and Ambros 1999 ; Gu, Jin et al. 2009). De plus, d'autres études montrent que la structure circulaire de l'ARNm est importante pour la régulation de la traduction par les miARN. Ainsi, la déstabilisation de la structure de la coiffe ou de la queue polyA diminue l'efficacité de répression par les miARN (Kiriakidou, Tan et al. 2007 ; Wakiyama, Takimoto et al. 2007 ; Djuranovic, Nahvi et al. 2012) .

Kiriakidou et ces collaborateurs ont pu montrer que la protéine Ago2 pouvait se fixer à la coiffe grâce à la présence de motifs aromatiques conservés (MC) présents au centre de la protéine Ago au niveau de son domaine Mid. Cette interaction entre Ago2 et la coiffe empêcherait ainsi le recrutement de l'eIF4E et l'initiation de la traduction (Kiriakidou, Tan et al. 2007). Deux ans plus tard, par des études structurales, des chercheurs montrent que la protéine Ago2 ne peut pas se fixer à la coiffe car sa structure est totalement différente du facteur eIF4E et que la présence de ces motifs aromatiques était statistiquement insignifiante (Kinch and Grishin 2009). Puis en 2010, d'autres études ont montré par des approches d'immunoprécipitation une interaction entre Ago2 et le complexe protéique de la coiffe CBP80/20 (Cap Binding protein 80/20), mais pas avec le facteur eIF4E (Choe, Cho et al. 2010). A ce jour, la seule étude qui n'ait pas encore été contredite a montré que l'inhibition de l'initiation de traduction par les miARN nécessitait uniquement le facteur eIF4A2 (Meijer, Kong et al. 2013).

- Répression d'autres étapes de la traduction

D'autres hypothèses ont été proposées, notamment que les miARN pourraient agir en dégradant les polypeptides naissants (Petersen, Bordeleau et al. 2006). L'hypothèse suggérée pour expliquer ce mécanisme, repose sur le fait que les miARN associés au complexe RISC recrutent une enzyme à activité protéolytique, qui est capable de dégrader le polypeptide en cours de synthèse par les polyribosomes (Nottrott, Simard et al. 2006). Néanmoins, à ce jour aucune protéase pouvant jouer ce rôle n'a été identifiée, et la protection des polysome de la protéolyse par adressage au RE n'affecte pas l'activité répressive des miARN (Pillai, Bhattacharyya et al. 2005).

(b) Déstabilisation de l'ARNm cible

En plus d'inhiber la traduction des ARNm cibles, les miARN peuvent déstabiliser l'ARNm cible et induire sa dégradation. Les études récentes ont permis d'éclairer ces mécanismes. En effet, Bazzini et ses collaborateurs ont pu montrer que miR-430 induisait une dé-adénylation

complète de l'ARNm cible chez le poisson zèbre (Bazzini, Lee et al. 2012). Une autre équipe a pu montrer en 2009, que lors d'une expression ectopique de miR-124 dans des cellules HEK (Human Embryonic Kidney), suivie d'une co-immunoprécipitation des ARNm liés aux protéines Ago, la diminution d'expression protéique observée était liée principalement à une dégradation des ARNm cibles (Hendrickson, Hogan et al. 2009). D'autre part, différentes expériences montrent que GW182 induit une déadénylation de l'ARNm cible par recrutement du complexe de déadénylation et de décoiffage, aboutissant à une dégradation complète induite par XRN1 (Parker and Song 2004 ; Eulalio, Rehwinkel et al. 2007). Enfin, la technologie récente de profilage des ribosomes qui permet de quantifier les transcrits en cours de traduction, montre que la déstabilisation des ARNm représente le mécanisme majoritaire associé à la diminution d'expression d'une protéine par un miARN (Guo, Ingolia et al. 2010) .

(c) Séquestration dans les p-Bodies

C'est en 1997 que furent découverts les P-Bodies (Processing-Bodies), des petites structures cytoplasmiques contenant l'exoribonucléase mXrn1p (Bashkirov, Scherthan et al. 1997). Ce n'est que plus tard, en 2002 que l'on découvre que ces structures renferment d'autres protéines impliquées dans la dégradation de l'ARNm (Eystathioy, Chan et al. 2002 ; Ingelfinger, Arndt-Jovin et al. 2002). En effet les p-Bodies jouent un rôle important dans le métabolisme de l'ARNm, ces structures renfermant non seulement des exoribonucléases comme XRN1, mais aussi des enzymes de décoiffage (Dcp1/2) ainsi que des protéines associées au complexe RISC comme GW182 et Ago2 ou les hélicases Rck/p54 et MOV10 (Kulkarni, Ozgur et al. 2010). GW182 et Rck sont non seulement indispensables pour la formation des p-Bodies, mais elles vont aussi permettre aux protéines Ago et aux ARN associées de se diriger vers ces structures. Si initialement il a été proposé que les mécanismes de répression post-transcriptionnels par les miARN s'effectuaient dans les p-bodies, il semblerait plutôt que les p-bodies pourraient constituer un lieu de stockage des ARNm réprimés, stockage réversible en fonction de l'environnement cellulaire (Pillai, Bhattacharyya et al. 2005).

V) Les méthodes d'identification de cibles de miARN

1) Les règles d'appariement du miARN avec ses cibles

Le complexe miRISC va pouvoir s'apparier de manière partiellement complémentaire à l'ARNm cible, le plus souvent dans sa région 3'UTR, cette région étant appelée MRE (miRNA Response Element). Il existe deux règles d'appariement majeures, qui définissent les règles utilisées par la plupart des outils bioinformatiques de prédiction de cibles.

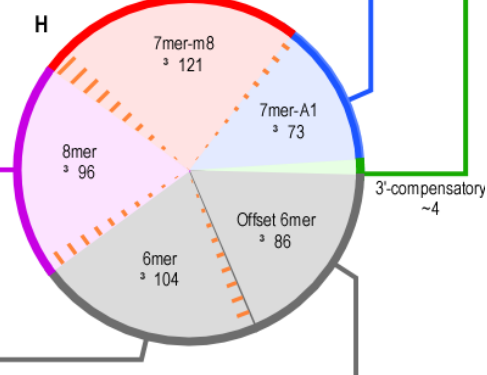
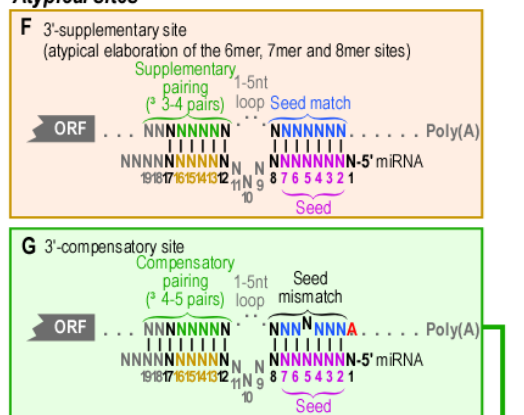
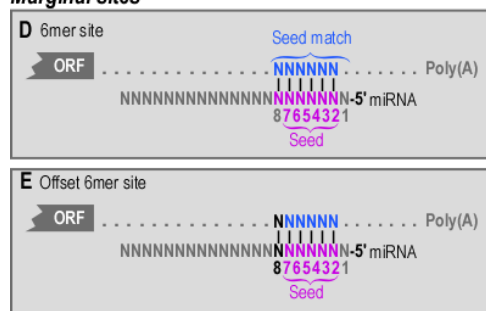
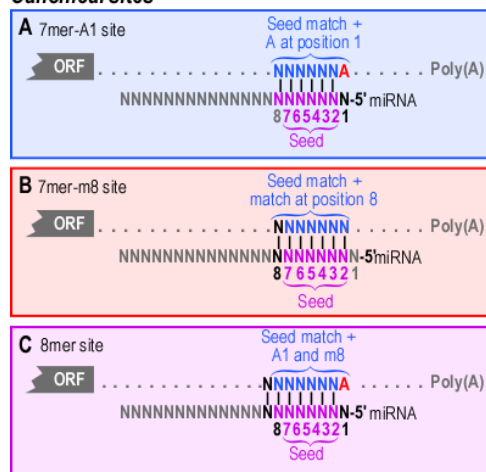


Figure 20 : Les différents types d'appariements :

(A - C) Types **d'appariements canoniques**, 7-8 nucléotides. Les tirets verticaux indiquent les appariements de type Watson-Crick. (D - E) **Appariements marginaux** de 6 nucléotides au niveau du seed. Ces sites 6mer ont généralement une efficacité réduite et sont aussi conservés que les sites canoniques. (F - G) **Sites atypiques** avec appariement en 3'. Pour les sites 3' supplémentaires (F), un appariement supplémentaire de 3 à 4 paires de bases au niveau des nucléotides 13-16 (orange) augmente la stabilité d'appariement et complète un site 6-8 nucléotides. (G) L'appariement 3' compensatoire de 4-5 paires de bases, généralement centré au niveau des nucléotides 13-16, va compenser un mésappariement au niveau de la région seed et créer ainsi un site fonctionnel (D'après Bartel, 2009)

(i) Le premier critère, qui constitue la règle la plus importante, est la notion de « seed » (ou « graine »). Le seed correspond à la région d'appariement parfait de type Watson-Crick entre le miARN et l'ARNm. Cette région comprend les nucléotides 2-7 en 5' du miARN (**figure 20A-C**). Cette règle est la plus importante dans les outils de prédictions bioinformatiques, car il a été montré que la majorité des sites prédits par la conservation inter-espèces de la région seed sont validés expérimentalement (Bartel 2004 ; Bartel 2009). De plus, une simple mutation dans cette région perturbe l'effet inhibiteur du miARN. Cependant, certains mésappariements dus à des mutations dans la région « seed » peuvent donner naissance à des appariements bancals de type « G-U wobble », fonctionnels mais diminuant l'efficacité de répression des cibles. L'appariement de la région seed suffit généralement pour réprimer l'expression d'un gène cible (Bartel 2009).

(ii) Les appariements présents en dehors de la région seed, précisément au niveau des nucléotides 9-12, sont généralement imparfaits, et empêchent ainsi le clivage de l'ARNm cible par Ago2. Cependant, dans de rares cas, l'appariement peut être parfait, entraînant alors un clivage de l'ARNm cible (Yekta, Shih et al. 2004). La région 3' contient souvent un niveau minimal de complémentarité au niveau des nucléotides 13-16, afin d'améliorer la spécificité et la stabilité d'interaction miARN-ARNm (**figure 20F**).

2) Des cas particulier d'appariements

Toutefois il est constaté que des miARN peuvent échapper aux règles d'appariement cités ci-dessus, ce qui peut introduire un biais dans l'utilisation des outils bioinformatiques.

(i) Il existe ainsi des exceptions à la règle du « seed » : l'exemple d'un miARN qui échappe à cette règle n'est autre que l'un des premiers miARN découvert « let-7 ». En effet, les deux MRE sur lin-41 montrent des mésappariement au niveau du seed, et sont pourtant parfaitement fonctionnels. Cependant, ces deux MRE se présentent sous forme d'un appariement étendu de 9 nucléotides, appelé appariement « 3' compensatoire ». Ces cas d'appariements sont rares et semblent ne représenter que 1% des sites conservés chez les mammifères (Bartel 2009). Les **appariements 3'** compensatoires semblent avoir été sélectionnés au cours de l'évolution, notamment chez *C.elegans* pour contrôler la régulation de l'expression d'un « master » gène par un miARN **unique** **durant** le développement, permettant ainsi à lin-41 de fixer spécifiquement let-7 et non pas d'autres miARN de la même famille, partageant le même seed (Abbott, Alvarez-Saavedra et al. 2005). Plus récemment, une nouvelle classe de sites, appelée sites « centrés » a été décrite, possédant 11-12 appariements consécutifs au centre du miARN (Shin, Nam et al. 2010).

(ii) Les « G-U wobble » représentent un second biais, par exemple dans le cas de miR-214 et une de ces cibles disp2 impliquée dans le développement du poisson zèbre. MiR-214 agirait sur trois sites MRE présentant un appariement de type « G-U Wobble » dans la région 5-6 du seed (Li, Flynt et al. 2008), ou encore lys-6 chez *c.elegans* où deux appariements « G-U Wobble » sont tolérés sur sa cible cog-1 (Didiano and Hobert 2006).

(iii) Bien que les MRE soient souvent localisés au niveau des régions 3'UTR, les expériences d'immunoprécipitation de composants du RISC couplée aux approches de séquençage à haut débit (HITS-CLIP pour « High-Throughput Sequencing of RNA isolated by CrossLinking ImmunoPrecipitation »), ont pu révéler l'existence de différents sites de fixation des miARN en dehors de la région 3'UTR des ARNm. En effet, plus de 25% des cibles sont localisées dans la région codante « CDS » (Chi, Zang et al. 2009). Parmi ces ARNm : DNMT3b (Duursma, Kedde et al. 2008) et Dicer (Forman, Legesse-Miller et al. 2008) chez l'homme, Nanog, Oct4 et Sox2 (Tay, Zhang et al. 2008) chez la souris. D'autre part, de manière peu fréquente un miARN peut aussi cibler la région 5'UTR d'un gène cible, cela s'accompagnant alors d'une activation de la traduction (Orom, Nielsen et al. 2008).

(iv) La structure secondaire de l'ARNm, la liaison de facteurs ribonucleoprotéiques ou bien encore la position du MRE, peuvent influencer l'efficacité d'appariement du miARN (Ameres, Martinez et al. 2007 ; Glorian, Maillot et al. 2011). De plus, il a été constaté que des régions de l'ARNm riches en éléments A/U à proximité du site de fixation du miARN, peuvent parfois améliorer ou même s'avérer nécessaire à la répression des cibles (Bhattacharyya, Habermacher et al. 2006; Didiano and Hobert 2006).

3) Les principales méthodes d'identification de cibles : approches *in silico* et expérimentales

Les algorithmes de prédiction de cibles se basent sur les règles moléculaires présentées dans le paragraphe précédent, principalement la complémentarité, la conservation et l'énergie de liaison de la région seed avec les extrémités 3'UTR des ARNm cibles (Doench and Sharp 2004 ; Min and Yoon 2010). Les outils de prédiction bioinformatique les plus populaires sont : TargetScan (Grimson, Farh et al. 2007), mais aussi miRanda (John, Enright et al. 2004), microCosm (Griffiths-Jones, Saini et al. 2008), PicTar (Krek, Grun et al. 2005), RNA22 (Miranda, Huynh et al. 2006), EIMMO (Gaidatzis, van Nimwegen et al. 2007), ou bien encore TargetSpy (Sturm, Hackenberg et al. 2010).

Les résultats de prédiction par ces différents algorithmes sont très souvent assez divergents (Bertero, Robbe-Sermesant et al. 2013). Ces différences résident essentiellement

dans le traitement de la « région seed », (i) en particulier la tolérance des « GU Wobble » ou appariements « bancals », (ii) la longueur des appariements dans le seed qui peut varier de 6, 7 ou 8 nucléotides, iii) le degré de conservation du site ou bien (iv) le contexte 3' UTR.

Il est acquis que ces approches *in silico* sont très utiles, mais qu'elles donnent un pourcentage élevé de faux positifs. L'efficacité de ces outils bioinformatiques peut être considérablement améliorée lorsqu'ils sont couplés avec des approches expérimentales, permettant de se rapprocher du contexte cellulaire. Par exemple, les approches transcriptomiques globales ou les expériences d'immunoprécipitation des composants du RISC comme Ago2 couplé au séquençage à haut débit (HITS-CLIP (Chi, Zang et al. 2009) /PAR-CLIP pour « PhotoActivable-Ribonucleoside-enhanced CrossLinking and ImmunoPrecipitation » (Hafner, Landthaler et al. 2010) permettent d'augmenter la spécificité par rapport aux protéines ou transcrits exprimés dans la cellule. La technique utilisée en routine au laboratoire, consiste à sur-exprimer ou inhiber les miARN d'intérêts, et analyser le transcriptome, ce qui va permettre à l'aide d'outils bioinformatiques comme miRanTop (Le Brigand, Robbe-Sermesant et al. 2010) d'analyser statistiquement l'enrichissement des cibles d'un miARN donné parmi les gènes dérégulés.

Les outils transcriptomiques peuvent être limitants dans le cas où le miARN agirait uniquement sur le niveau d'expression de la protéine. Les approches protéomiques quantitatives peuvent être donc aussi intéressantes, comme le SILAC (Stable Isotope Labeling by Amino acids in Cell culture) (Ebner and Selbach 2011), technique basée sur la spectrométrie de masse pour la détection de protéines marquées métaboliquement par des isotopes non radioactifs d'acides aminés comme la lysine et l'arginine.

Une fois que la liste des cibles d'intérêt est établie, les cibles prédites doivent ensuite être validées expérimentalement. Il existe différentes expériences biologiques permettant de valider les prédictions *in silico*. Parmi les validations expérimentales les plus courantes, on retrouve les stratégies de surexpression des miARN et ou leur inhibition en mesurant ensuite l'effet sur l'ARNm cible par l'utilisation de Northern blot et/ou PCR quantitative, mais aussi de western blot ce qui permet de voir l'impact sur la protéine traduite. L'utilisation des essais luciférase permet de valider une interaction directe entre le miARN et sa cible. La partie 3'UTR contenant le MRE est clonée dans un vecteur exprimant la luciférase, et l'effet du miARN d'intérêt est quantifié en mesurant l'activité de la luciférase.

4) Quelles conséquences sur le nombre de cibles ?

Une redondance importante existe au niveau des séquences de nombreux miARN, qui peuvent être conservées à quelques nucléotides près, et qui ciblent donc les mêmes gènes. C'est aussi le cas pour les familles de miARN qui partagent uniquement la même séquence seed et sont prédits pour réguler les mêmes cibles (Bertero, Grosso et al. 2012) . Ceci explique pourquoi la déplétion d'un miARN n'a souvent pas de conséquences marquées, et peut souvent être contournée dans un système biologique. En théorie, un miARN peut réguler en moyenne 300 cibles (Bartel 2009). Cette moyenne est réduite à une centaine de cibles prédites lors d'une surexpression du miARN d'intérêt dans des cellules *in vitro*. De plus, un ARNm cible peut être régulé par plusieurs miARN, mais aussi par d'autres facteurs dépendants du contexte biologique, par exemple un environnement de stress comme l'hypoxie, qui va induire l'expression de différentes protéines comme les RBPs (RNA binding Proteins) qui peuvent moduler significativement l'interaction miARN/ARNm cible (Gorospe, Tominaga et al. 2011). Enfin, l'expression de pseudogènes, mais aussi d'ARN non-codants tels que des ARN circulaires (Ebert and Sharp 2010; Hansen, Jensen et al. 2013), tout récemment identifiés, peuvent aussi entrer en compétition avec le gène d'intérêt en agissant comme des « éponges » fixant ainsi les mêmes miARN sur des régions MRE conservés.

Ainsi, les interactions miARN/ARNm cibles représentent un réseau complexe de part le très grand nombre d'interactions possibles, et d'autre part le contexte biologique de ces interactions (Bartel 2009). Ces propriétés renforcent le fait qu'il est nécessaire voire même indispensable de valider expérimentalement les prédictions bioinformatiques, idéalement dans des modèles cellulaires qui se rapprochent le plus possible du contexte physiologique où est exprimé le miARN d'intérêt.

VI) Fonctions biologiques des miARN : des régulateurs fins des processus biologiques

Les systèmes biologiques utilisent une variété de mécanismes pour le maintien des fonctions importantes, face aux différentes perturbations environnementales et génétiques. Dans ce contexte, les miARN peuvent ajouter un degré de robustesse au système. Ils agissent très souvent en générant différentes boucles de régulation, dont le but est de (i) renforcer le programme transcriptionnel en amplifiant l'activation ou la répression de voies de signalisation impliquées lors du développement ou lors de phénomènes de différenciation (Stark, Brennecke et al. 2005) ; (ii) réprimer les transcrits inadaptés lors des phases de transition notamment au cours du développement (Stark, Brennecke et al. 2005 ; Sood, Krek et al. 2006 ; Tsang, Zhu et al. 2007) et (iii) exercer un pouvoir tampon en ciblant des transcrits

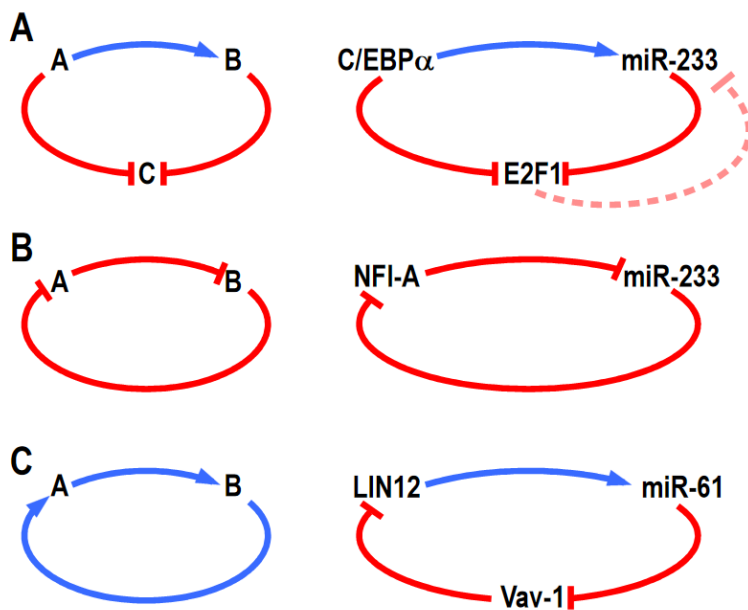


Figure 21 : Exemples de boucles de régulations induites par les miARN.

A) Boucle d'anticipation induisant une inhibition du régulateur de cycle cellulaire E2F1 dans la granulopoïèse.

B) Boucle de rétroaction mutuelle négative contribuant à la bi-stabilité entre précurseurs myéloïdes et granulocytes.

C) Boucle de rétrocontrôle positif permettant de renforcer l'engagement vers la différenciation des cellules vulvaires chez les nématodes. (D'après Ebert, 2012)

aberrants n'ayant pas de rôle à l'état physiologique, et qui peuvent activer des voies de signalisation inappropriées, par exemple lors d'états de stress (Klein, Lioy et al. 2007 ; Ebert and Sharp 2012).

Il existe trois principales boucles de régulation, permettant de schématiser de manière simplifiée, les fonctions générales des miARN:

1) Les boucles d'anticipation

Cette boucle représente un schéma d'expression anti corrélatif, impliquant une majorité de miARN. Dans ce contexte, un gène (A) inhibe ou active un miARN, et en même temps le gène (A) et le miARN inhibent un gène (C). Ce type de boucle renforce considérablement l'inhibition du composant en aval qui est souvent un facteur de transcription, en agissant de manière redondante sur son expression. Ainsi, une perte transitoire du composant (A) peut être remplacée par le composant (B) qui représente le miARN. C'est le cas de miR-223 induit par le facteur de transcription C/EBP α (CCAAT/enhancer-binding protein alpha). MiR-223 et C/EBP α répriment l'expression du facteur de transcription E2F1 durant la granulopoïèse (Pulikkan, Dengler et al. 2010) (**figure 21A**). De plus, dans cet exemple un miARN peut aussi être inhibé indirectement par le composant (C) lorsque c'est un facteur de transcription, en verrouillant cette boucle, ainsi E2F1 inhibe en retour miR-223. La combinaison d'une boucle d'anticipation et de rétrocontrôle, va permettre notamment d'amortir les fluctuations transitoires pour une plus grande stabilité du contrôle transcriptionnel (Pulikkan, Dengler et al. 2010 ; Ebert and Sharp 2012).

2) Les boucles de rétroaction négative

Ces boucles concernent souvent les miARN exprimés de manière tissu spécifique, et qui de manière redondante renforcent la même décision cellulaire pour maintenir un état stable. Ici, un gène (A) inhibe l'expression d'un miARN qui en retour inhibe l'expression du gène (A). Ces boucles de rétroactions négatives jouent un rôle important dans le contrôle de transitions impliquées dans la différenciation cellulaire. Ainsi, le facteur de transcription NFI-A (Nuclear factor 1 A-type) réprime l'expression de miR-223 dans les précurseurs myéloïdes. Lorsque leur différenciation est induite suite à un traitement à l'acide rétinoïque, miR-223 s'accumule et réprime l'expression de NFI-A afin de prévenir leur retour à l'état non différencié (**figure 21B**) (Fazi, Rosa et al. 2005 ; Ebert and Sharp 2012).

3) Les boucles de rétrocontrôle positif

Les décisions cellulaires prises au cours du développement ou d'un stress cellulaire peuvent aussi être renforcées par les boucles de rétrocontrôle positives. Dans ce cas, un gène (A), tel qu'un facteur de transcription et un miARN s'activent mutuellement. L'activation induite par le miARN se fait par l'intermédiaire d'une inhibition d'un autre gène impliqué dans la répression du gène (A). Ainsi, chez *C.elegans*, LIN12 active la transcription de miR-61, qui va réprimer l'expression de vav-1 (guanine nucleotide exchange factor), un régulateur négatif de l'expression de LIN12 (**figure 21C**) (Yoo and Greenwald 2005 ; Ebert and Sharp 2012).

Les miARN ont été impliqués dans la régulation de la plupart des processus biologiques. Ils jouent ainsi des fonctions cruciales lors du développement embryonnaire, dans le contrôle de la différenciation, prolifération et survie cellulaire ainsi que dans les réponses aux stress, aux infections virales ou dans l'adaptation au métabolisme cellulaire. Ils ont donc aussi été impliqués dans la plupart des pathologies associées à une dérégulation de ces mécanismes, notamment le diabète, les pathologies auto-immunes et inflammatoires ou le cancer. Mon exposé se limitera ici à l'implication des miARN dans les processus fibrotiques.

VII) MiARN et processus fibrotique

1) Généralités

C'est en 2007 que le premier miARN dérégulé dans la fibrose a été cité (van Rooij, Sutherland et al. 2007). Les chercheurs ont montré que miR-208, un miARN exprimé spécifiquement dans les cardiomyocytes, était un médiateur de la fibrose cardiaque.

Les mécanismes de progression de la fibrose sont similaires quel que soit l'organe atteint, il est donc important de s'intéresser aux dérégulations des miARN dans différents cas pathologiques impliquant un processus de fibrose, ce qui offre une vue plus générale des différentes voies de signalisation qu'orchestrent les miARN, qui sont bien souvent complexes et encore mal comprises .

On l'aura remarqué dans le chapitre précédent, le TGF- β est la molécule clé de la fibrose pulmonaire et représente la cible thérapeutique centrale. Cependant, le TGF- β est une cytokine pléiotropique, aux multiples effets biologiques, et son blocage chronique n'est pas sans risque. En effet, l'inhibition complète du TGF- β pourrait induire comme chez la souris

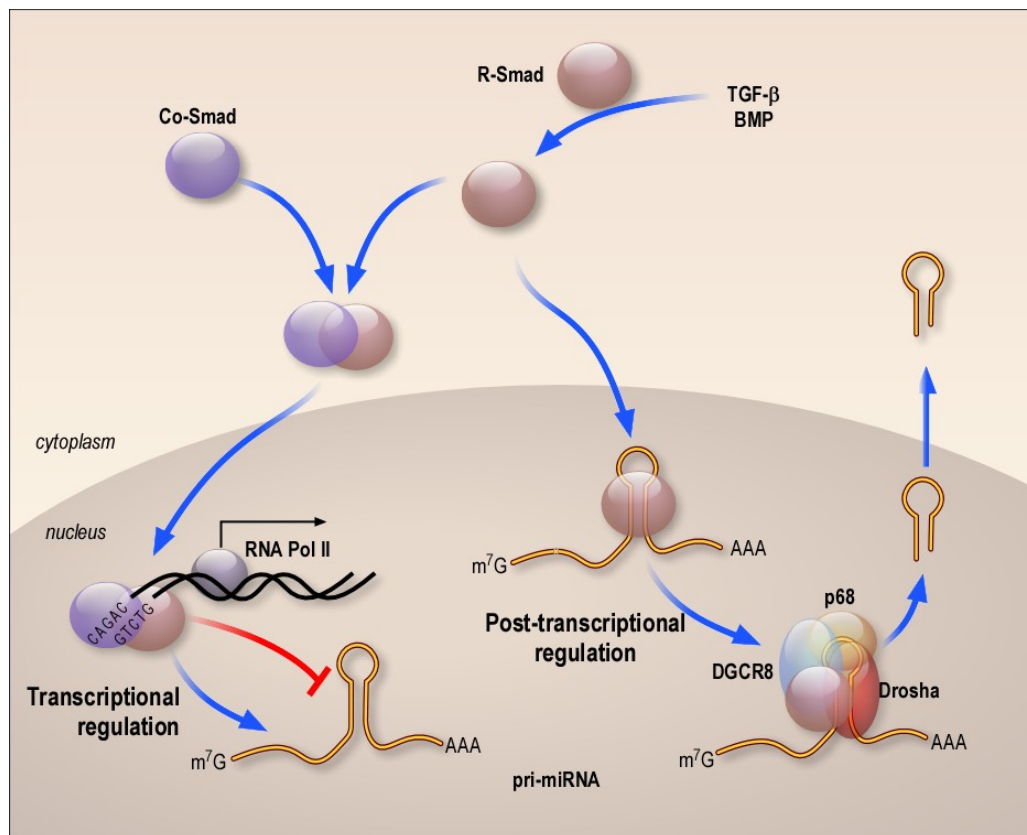


Figure 22 : Rôle des protéines Smads dans la régulation de la transcription et de la maturation des miARN (D'après Blahna, 2013)

une forte inflammation et un décès précoce (Kulkarni, Huh et al. 1993). Toutefois, il est peut être possible de contourner son inhibition complète par une compréhension approfondie des miARN impliqués dans cette voie de signalisation.

2) TGF- β et miARN : des liens complexes

De nombreux miARN ont été montrés régulés par le TGF- β , au niveau transcriptionnel mais aussi de manière plus originale au niveau de leur la biogenèse (**figure 22**) (Butz, Racz et al. 2012). En retour, la grande majorité des acteurs de la voie du TGF- β sont également des cibles de miARN.

3) La régulation transcriptionnelle des miARN par les protéines Smad

La régulation transcriptionnelle peut se faire de manière (i) directe en interagissant avec des promoteurs spécifiques induisant ainsi une activation ou une répression de la transcription des miARN, mais aussi de manière (ii) indirecte par l'interaction des protéines Smad avec d'autres facteurs protéiques.

(a) La répression directe de la transcription

Smad3 a été impliquée directement dans la répression de l'expression de plusieurs miARN. Des expériences de ChIP anti-Smad3 ont permis de confirmer l'interaction de Smad3 avec le promoteur de let-7, induisant ainsi sa répression lors de la fibrose pulmonaire induite par bléomycine chez la souris (Pandit, Corcoran et al. 2010). De même, l'utilisation d'un modèle de fibrose rénale induite par obstruction urétérale unilatérale de souris sauvages ou bien Smad3^{-/-}, montre que contrairement aux souris Smad3^{-/-} résistante à la fibrose, les souris contrôles développent une fibrose rénale associée notamment à une répression directe de la famille de miR-29 par Smad3 (Qin, Chung et al. 2011). Enfin, la stimulation de myoblastes C2C12 déficientes pour Smad3 par le TGF- β ne conduit plus à la répression de l'expression de miR-24, contrairement aux cellules C2C12 sauvages, démontrant ainsi l'implication de Smad3 dans la répression de l'expression de ce miARN (Sun, Zhang et al. 2008).

(b) Activation directe de la transcription par la voie classique

De nombreux miARN ont été montrés surexprimés suite à l'activation de la voie canonique du TGF β , mais souvent de manière tissu-spécifique. Ainsi, un total de 28 micro-ARN sont significativement surexprimés suite à une stimulation de cellules épithéliales de glandes mammaires de souris (NMuMG) par le TGF- β . À contrario, le même traitement TGF- β sur les cellules NMuMG déficientes pour Smad4 abolit cette induction (Kong, Yang et al. 2008). Pour un de ces miARN, miR-155, une étude classique de promoteurs par l'utilisation

d'un vecteur luciférase contenant la séquence promotrice du gène BIC, confirme que l'induction de miR-155 est dépendante de l'interaction de Smad4 avec cette région promotrice (Kong, Yang et al. 2008). Dans un autre modèle, le modèle de fibrose rénale induite par obstruction urétérale unilatérale de souris, un criblage d'expression à l'aide de microarrays et de PCR-quantitative, a révélé une induction importante de miR-192. Celle-ci est retrouvée *in vitro* après traitement par le TGFβ dans les cellules épithéliales rénales humaines (TEC), (Chung, Huang et al. 2010). Des expériences de ChIP anti-Smad3, suite à une stimulation TGF-β à la fois dans des cellules épithéliales rénales humaines (TEC) et des fibroblastes embryonnaires de souris (MEF), révèlent en effet que l'induction de miR-192 est régulée dans les deux types cellulaires par l'interaction de Smad3 avec une région SBE conservée (Smad Binding Element) dans le promoteur de miR-192 (Chung, Huang et al. 2010). Tout récemment, l'équipe de Kaminski a mis en évidence l'augmentation de l'expression d'un cluster de 24 miARN localisé sur le chromosome 14q32 dans des biopsies de poumons de patients avec une IPF. Plusieurs sites de fixation de SMAD3 ont été trouvés dans le promoteur putatif de ce cluster et en accord avec ces hypothèses, plusieurs de ces miARN, dont miR-154 est induit en réponse au TGFβ dans des fibroblastes pulmonaires (Milosevic, Pandit et al. 2012).

(c) Contrôle indirect de la transcription

En plus de l'association directe des protéines Smad3/4 avec les promoteurs de gènes codants pour des miARN, les protéines Smad peuvent moduler l'expression des miARN de manière indirecte *via* l'activation de voies de signalisation alternatives. C'est par exemple le cas du cluster miR-143~145, induit à la fois par le TGF-β et la protéine BMP-4 (Bone Morphogenetic Proteins) dans les cellules vasculaires du muscle lisse (Davis-Dusenbery, Chan et al. 2011). Cette régulation est liée à l'activation du facteur SRF (Serum response factor) et de la myocardine, après un traitement TGF-β, conduisant à l'activation du facteur MRTF (Myocardin related transcription factor).

(d) Régulation épigénétique des miARN

Comme tout facteur de transcription, l'activité des protéines Smads dépend du contexte épigénétique cellulaire (Kaneda, Fujita et al. 2011). Ainsi, dans un modèle de cellules MEF transfectées avec l'oncogène RasV12, les analyses de ChIP-seq et de ChIP-on-chip anti Smad-1 révèlent qu'une multitude de régions promotrices, cibles de Smad-1 sont modifiées par un gain de tri-méthylation sur la lysine-4 de l'histone H3 (H3K27me3) ou une perte de tri-méthylation sur la lysine-27 de l'histone H3 (H3K4me3), induisant ainsi une

activation ou une inhibition d'expression de miARN impliqués dans la sénescence induite par Ras (Kaneda, Fujita et al. 2011). De plus, les miARN sous contrôle de la voie du TGF- β peuvent eux même être à l'origine de modifications épigénétiques. C'est le cas de miR-29 et miR-206, impliqués dans la différenciation des cellules musculaires (Winbanks, Wang et al. 2011). En effet, le signal induit par le TGF- β est associé d'une part à une augmentation d'expression de l'histone déacetylase-4 (HDAC4) *via* la liaison de Smad3 sur son promoteur. D'autre part, HDAC4 est une cible de miR-29 et de miR-206. Ainsi, l'inhibition de l'expression de ces deux miARNs par le TGF- β permet de maintenir l'expression de HDAC4, et par conséquent maintenir un état différencié stable (Winbanks, Wang et al. 2011).

(e) Régulation post-transcriptionnelle

La voie de signalisation induite par le TGF- β a non seulement un impact sur la transcription des miARN mais aussi sur leur maturation (Blahna and Hata 2013).

En étudiant l'implication de miR-21 sur la répression de l'expression de PDCD4 (programmed cell death 4) dans les maladies cardiovasculaires et le cancer, l'équipe d'Akiko Hata a découvert que l'induction de la forme mature de miR-21 par le TGF- β était sous contrôle post-transcriptionnel, l'expression du pri-miR-21 restant stable (Davis, Hilyard et al. 2008). L'analyse des profils d'expression de miARN par microarray après un traitement TGF β ou BMP sur des cellules primaires du muscle lisse d'artères pulmonaires humaines (PASMCs) révèle qu'un sous ensemble de miRNA induits possèdent cette même particularité. Ces miARN partagent une séquences consensus SBE (Smad Binding Element) : 5'-**CAGAC**-3' au niveau de la tige boucle des transcrits primaires de miARN induits (Davis, Hilyard et al. 2010). Les expériences d'immunoprécipitation d'ARN en utilisant un tag GST-Smad démontrent une interaction directe entre les protéines Smad et la séquence consensus SBE des pri-miARN. De plus, une mutation dans la séquence SBE du pri-miR-21 comparé au pri-miR-21 contrôle, abolit sa maturation en miARN, en empêchant le recrutement des Smad au niveau de la tige boucle. Toutefois, un siARN dirigé contre Smad4 n'affecte pas la maturation de miR-21, mais est nécessaire à sa régulation transcriptionnelle (Yu, Bi et al. 2008). Un complexe Smad2/3 peut ainsi se lier directement au niveau du pri-miARN, ce qui va favoriser le recrutement de l'endonucléase Drosha et accélérer leur maturation (Davis, Hilyard et al. 2010 ; Butz, Racz et al. 2012).

VIII) Une régulation réciproque: contrôle de la voie canonique TGF- β par les miARN

La voie du TGF- β est régulée de façon complexe par les miARN. En effet, plusieurs miARN agissent sur cette voie à travers trois mécanismes d'actions : (i) en ciblant directement les récepteurs du TGF- β , (ii) en inhibant directement l'expression des effecteurs induits par sa voie canonique, à savoir les protéines Smad, et enfin (iii) en régulant l'expression des gènes qui sont sous contrôle du TGF- β (Butz, Racz et al. 2012).

1) Contrôle de l'expression des récepteurs au TGF- β

Différentes études ont mis en évidence la régulation de l'expression des récepteurs au TGF- β RI et TGF- β RII par les miARN, en relevant l'importance de cette régulation dans différentes pathologies (Volinia, Calin et al. 2006 ; Braun, Hoang-Vu et al. 2010; Pan, Luo et al. 2010 ; Denby, Ramdas et al. 2011). L'expression du TGF- β RI et de Smad2 est ainsi élevée dans la plupart des cancers anaplastiques thyroïdiens (Braun, Hoang-Vu et al. 2010) alors que celle de la famille miR-200 et miR-30, ciblant ces molécules s'avèrent drastiquement sous-exprimée, suggérant ainsi un mécanisme stimulant la TEM à travers l'inhibition de la répression du TGF- β RI (Braun, Hoang-Vu et al. 2010 ; Denby, Ramdas et al. 2011). De même, let-7 a été montré réguler la voie du TGF- β en inhibant l'expression du TGF- β RI au cours du développement hépatique (Tzur, Israel et al. 2009). D'autre part, plusieurs études révèlent un contrôle du TGF- β RII par les miARN. L'équipe de Yang a ainsi pu montrer à travers l'étude de la fibrose artérielle induite par la nicotine chez le chien, que miR-133 et miR-590 répriment respectivement l'expression de TGF- β 1 et son récepteur TGF- β RII. Ainsi, l'inhibition des deux miARN contribue à une augmentation de la signalisation induite par le TGF- β (Shan, Zhang et al. 2009).

2) Contrôle direct de l'expression des protéines Smad

En plus de leur fonction dans le contrôle de l'expression des miARN, les protéines Smad sont elles même des cibles directes de miARN. A ce jour, la plupart des protéines Smad sont des cibles validées pour au moins un miARN.

Les équipes de Kaminski et McCaffrey ont pu montrer dans le modèle de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine chez la souris (Liu, Friggeri et al. 2010) et la fibrose hépatique induite par le virus de l'hépatite C (Marquez, Bandyopadhyay et al. 2010) que Smad7 est une cible directe de miR-21. Ainsi en réprimant Smad7, miR-21 amplifie le signal induit par la voie du TGF- β . D'autres exemples ont été décrits comme, Smad3 qui est une cible de miR-140, jouant un rôle dans les adénomes hypophysaires (Butz, Liko et al. 2011)

mais aussi Smad4 qui est une cible de miR-146a dans les cellules leucémiques (APL), augmentant ainsi le potentiel invasif des cellules cancéreuses par TEM induite *via* le TGF- β (Zhong, Wang et al. 2010).

3) Contrôle des gènes induit par la voie du TGF- β

Les gènes induits par la voie du TGF- β sont aussi des cibles de miARN. En effet, en plus de la répression de l'expression de let-7 par Smad3 (cité dans le paragraphe 3-a page 48), l'équipe de Kaminski a aussi montré que HMGA2 (High-mobility group AT-hook 2), une cible validée de let-7, était surexprimée après stimulation par le TGF- β . Ainsi let-7 joue un rôle important dans la régulation de la voie du TGF- β en inhibant l'expression de l'un de ses effecteurs HMGA2 (Pandit, Corcoran et al. 2010). D'autres exemples de gènes induits par le TGF- β comme ZEB1, ZEB2, Snail1, Snail2 impliqués dans la répression des E-cadhérines par leurs liaisons aux motifs d'ADN E-box ont été identifiés comme cibles de miARN. En particulier, la famille miR200, en ciblant ZEB1 et ZEB2, joue un rôle clé dans le contrôle de la TEM (Korpala, Lee et al. 2008 ; Ikushima and Miyazono 2010; Casas, Kim et al. 2011).

4) Contrôle de l'expression des miARN par les voies alternatives du TGF- β

Plusieurs voies alternatives ont été impliquées dans la régulation de l'expression de miARN en réponse au TGF β . C'est par exemple le cas de la voie PI3K/Akt, qui va induire la phosphorylation de KSRP (KH-type splicing regulatory protein). Cette protéine est capable de se lier aux ARN simple brins et engendrer différents processus comme l'épissage alternatif ou le recrutement des exosomes au niveau des ARNm cibles au niveau 3'UTR en induisant leur dégradation. Le rôle de KSRP dans l'activité du microprocesseur a été découvert en 2009, lorsque Trabucchi et ses collaborateurs découvrent l'existence de motifs GGG dans la boucle terminale de let-7a (Trabucchi, Briata et al. 2009). D'une manière intéressante, ce facteur, une fois phosphorylé par AKT, va transloquer au noyau, se lier au niveau de la boucle terminale du Pri-miARN et faciliter sa prise en charge par Drosha (Trabucchi, Briata et al. 2009). Cette fonction a été par la suite élargie à d'autres miARN comme miR-155 et miR-206 (Ruggiero, Trabucchi et al. 2009 ; Briata, Lin et al. 2012), suggérant ainsi que KSRP agirait en augmentant l'activité catalytique de Drosha.

IX) Les principaux miARN dérégulés dans les processus fibrotiques

1) Le rôle de miR-133 et miR-30 dans la régulation de l'expression de TGF β /CTGF

Des études effectuées dans des modèles de fibrose cardiaque ont impliqué miR-30 et miR-133 comme deux régulateurs clés de l'expression du CTGF. Le CTGF étant induit par

l'activation du TGF β et potentialisant son effet en activant sa forme latente, ces régulations ont des conséquences importantes sur les processus fibrotiques. MiR-133 est un miARN spécifique du tissu cardiaque et son expression est limitée au cardiomyocytes, alors que miR-30 est exprimé à la fois dans les fibroblastes cardiaques et cardiomyocytes ainsi que d'autres tissus comme le poumon. Cependant, l'effet de ces deux miARN n'est pas additif sur la diminution d'expression du CTGF, cela étant expliqué par la superposition des régions complémentaire au seed des deux miARN au niveau de la partie 3'UTR du CTGF, engendrant ainsi un phénomène de compétition. De plus, miR-133 agirait aussi directement sur la voie du TGF β en ciblant respectivement TGF β 1 et TGFBR2 (Liu, Bezprozvannaya et al. 2008). Dans le cas de la FPI, miR-30c est aussi réprimé dans le poumon fibrosé, augmentant ainsi l'expression du CTGF (Duisters, Tijssen et al. 2009) .

2) Le rôle de Let-7 dans l'EMT

Let-7 est un des miARN antifibrotiques les plus étudiés, son expression dans le poumon est localisée dans les cellules épithéliales alvéolaires. L'inhibition *in vitro* et *in vivo* des membres de la famille let-7 induit une surexpression de marqueurs mésenchymateux et une diminution des marqueurs épithéliaux, suggérant une activation de l'EMT. Cette inhibition induit la surexpression de HMGA2 (high mobility group AT-hook 2) une cible connue de ce miARN, qui pourrait contribuer au processus fibrotique. Ainsi, il a été montré que HMGA2, agirait sur la voie Ras en stimulant la prolifération cellulaire et l'EMT dans le cancer du pancréas (Watanabe, Ueda et al. 2009), suggérant des mécanismes similaires dans la fibrose pulmonaire. L'induction de l'expression de HMGA2 est également accompagnée de l'induction d'autres facteurs comme KRAS, MYC, cycline D2, cdk6 et cdc25a qui sont aussi des cibles de let-7 et pourraient jouer un rôle dans la fibrose pulmonaire (Pandit, Corcoran et al. 2010). Une autre cible de let-7, l'IGF1 est surexprimée chez les patients IPF, son niveau d'expression étant particulièrement élevé dans les macrophages, les fibroblastes et les cellules épithéliales, potentialisant ainsi la production de collagène. L'action de let-7 passerait ainsi par la régulation de l'expression de multiples cibles pro-fibrotiques. Cependant si l'inhibition de let-7 augmente les effets profibrotiques, aucune étude n'a encore montré que son administration *in vivo* suffirait à diminuer ou prévenir la fibrose (Pandit, Corcoran et al. 2010 ; Pandit, Milosevic et al. 2011).

3) Rôle de miR-155 dans les relations épithélio-mésenchymateuses

Contrairement à let-7 qui semble jouer un rôle protecteur contre la fibrose, des travaux de notre équipe ont montré que l'expression de miR-155 augmentait en fonction de l'état

d'avancement de la fibrose pulmonaire induite par la Bléomycine chez la souris. *In vitro*, un traitement de fibroblastes humains par le TNF- α ou l'IL-1 β induit l'expression de miR-155. MiR-155 semble jouer un rôle important dans la ré-épithélialisation en ciblant directement le facteur de croissance des fibroblastes (KGF, FGF-7), tout en ayant aussi un impact important sur la mobilité cellulaire qui pourrait être liée à d'autres cibles de miR-155 identifiées dans des analyses *in silico*, telles que CYR61 et RHEB, deux régulateurs importants de l'adhésion cellulaire (Pottier, Maurin et al. 2009).

4) Le rôle de miR-29 et miR-449 dans la régulation de l'expression de la matrice extracellulaire

La famille de miR-29 comprend trois membres miR-29a/b/c, tous significativement sous exprimés dans les poumons de patients IPF mais aussi dans différents types de fibrose. La famille miR-29 a été bien caractérisée comme jouant un rôle régulateur majeur dans la synthèse de la matrice extracellulaire et leur expression a été montrée fortement diminuée après stimulation par le TGF β notamment dans les fibroblastes cardiaques (van Rooij, Sutherland et al. 2008).

Une étude récente montre que miR-29 inhibe l'expression de différents membres du collagène en ciblant directement le PDGF-C (platelet derived growth factor)/ et IGF-L (insuline like growth factor), son inhibition est ainsi responsable de la différenciation des cellules HSC (hépatocytaires stellate cells) en myofibroblastes (Kwiecinski, Elfimova et al. 2012). De manière tout à fait intéressante, des essais précliniques chez la souris indiquent que l'administration de miR-29b synthétique par voie systémique prévient le développement de la fibrose induite par la bléomycine (Xiao, Meng et al. 2012).

Dans le cas de pathologies liées à une expression excessive de MEC comme les néphropathies chroniques qui surviennent souvent suite à des transplantations de reins, l'expression de miR-449 a/b est diminuée de manière drastique (Muth, Theophile et al. 2010). MiR-449 réprime l'expression de PAI-1, l'inhibiteur principal des activateurs du plasminogène (tPA/uPA). De ce fait, les auteurs suggèrent que l'inhibition de miR-449 pourrait être responsable de l'accumulation excessive de MEC par ce mécanisme.

5) Le rôle profibrotique de miR-21 et miR-23a

MiR-21 a été identifié comme étant un « oncomir » dans de très nombreux cancers, et de par son expression ubiquitaire est un des miARN les plus étudiés (Kumarswamy, Volkmann et al. 2011). L'évidence du rôle profibrotique de ce miARN est multiple, avec une implication dans différents types de fibroses comme la fibrose pulmonaire, rénale, et cardiaque (Thum, Gross

et al. 2008; Liu, Friggeri et al. 2010 ; Chau, Xin et al. 2012). Dans le poumon, plusieurs études montrent que l'expression de miR-21 colocalise avec l'expression de l'alpha-SMA dans les myofibroblastes issus de patients IPF et que son expression est proportionnelle à l'état d'avancement de la fibrose chez la souris. Le lien entre miR-21 et la voie du TGF β a été démontrée en utilisant des souris exprimant un dominant négatif du TGF β RII, ce qui a eu pour conséquence de bloquer l'induction du miARN après instillation de bléomycine (Liu, Friggeri et al. 2010). De plus, miR-21 exerce un rétrocontrôle positif sur la voie du TGF β en ciblant Smad7. Il est important de noter que l'utilisation d'un antimiR-21 permet de diminuer les effets profibrotiques induits après stimulation par le TGF- β ou bien suite à une instillation bléomycine *in vivo* (Liu, Friggeri et al. 2010). Mir-21 est fortement exprimé dans les fibroblastes issus des biopsies de souris atteintes de fibrose cardiaques (Thum, Gross et al. 2008). Son augmentation d'expression est responsable de l'activation de la voie MAP kinase à travers l'inhibition de Spry1 (Sprouty homolog 1) et par ce mécanisme miR-21 contribue à la survie des fibroblastes cardiaques et leur sécrétion de facteur de croissance profibrotiques comme le TGF- β . D'autres études ont pu approfondir le rôle de miR-21 dans la fibrose rénale en montrant que la surexpression de miR-21 dans les cellules épithéliales tubulaires est inhibée en absence de Smad3 mais pas de Smad2. Les souris déficientes en Smad3 sont protégées de l'induction de fibrose rénale après obstruction urétérale unilatérale. Au contraire, les souris déficientes Smad2 montrent une augmentation d'expression de miR-21 accompagnée de fibrose. Smad3 interagirait directement avec la région promotrice de miR-21 afin d'augmenter son expression (Zhong, Chung et al. 2011).

Chau et ses collaborateurs ont montré que miR-21 est surexprimé dans la fibrose rénale induite par obstruction urétérale chez la souris et chez les patients atteints de néphropathies après transplantation rénale. Les souris KO mir-21 ont moins de fibrose après obstruction urétérale unilatérale comparé aux souris contrôles. Le rôle profibrotique de miR-21 est du à l'inhibition de PPAR α , une cible directe de miR-21. Ainsi miR-21 en ciblant PPAR α induit une perturbation du métabolisme des lipides et une activation de la voie PI3K/Akt responsable de l'aggravation de la fibrose rénale. De plus, miR-21 réprime directement l'expression de l'inhibiteur mitochondrial des espèces réactives d'oxygène Mpv17l dans les cellules épithéliales, et ainsi aggrave les dommages épithéliaux générés par le stress oxydatif. L'ensemble de ces résultats montrent que miR-21 contribue à la fibrose rénale en aggravant les dommages des cellules épithéliales et l'activation des fibroblastes. Cependant, le rôle de miR-21 est controversé notamment dans la fibrose cardiaque (Patrick, Montgomery

Tableau3: Potentiel thérapeutique de la modulation des FibromiR

Targeted miRNA	Tissue	Effect	Therapeutic strategy	Approach ^a	Delivery ^b	Ref
miR-1	Heart	Anti-fibrotic	Replacement therapy	Adeno-associated virus	I.V.	(Karakikes, Chaanine et al. 2013)
miR-15 family	Heart	Pro-fibrotic	miRNA inhibition	Tiny LNA	I.V.	(Hullinger, Montgomery et al. 2012)
miR-21	Heart Lung Kidney	Pro-fibrotic	miRNA inhibition	AntagomiR (Heart) LNA–DNA mixmer (Lung) cEt-modified anti-miR (Kidney)	I.V. (Heart) I.P., I.T. (Lung) I.P.(Kidney)	(Thum, Gross et al. 2008) (Liu, Friggeri et al. 2010) (Chau, Xin et al. 2012)
miR-24	Heart	Anti-fibrotic	Replacement therapy	Lentivirus	Intra-cardiac	(Wang, Huang et al. 2012)
miR-29b	Lung	Anti-fibrotic	Replacement therapy	Sleeping beauty transposon system	I.V.	(Xiao, Meng et al. 2012)
miR-34a	Heart	Pro-fibrotic	miRNA inhibition	LNA–DNA mixmer AntagomiR	S.C.	(Bernardo, Gao et al. 2012) (Boon, Iekushi et al. 2013)
miR-101	Heart	Anti-fibrotic	Replacement therapy	Adenovirus	Intra-cardiac	(Pan, Sun et al. 2012)
miR-192	Kidney	Pro-fibrotic	miRNA inhibition	LNA-DNA mixmer	S.C.	(Putta, Lanting et al. 2012)
miR-199b	Heart	Pro-fibrotic	miRNA inhibition	AntagomiR	I.P.	(da Costa Martins, Salic et al. 2010)
miR-200b	Kidney	Anti-fibrotic	Replacement therapy	miRNA mimics	I.V.	(Oba, Kumano et al. 2010)
miR-208	Heart	Pro-fibrotic	miRNA inhibition	LNA–DNA mixmer	I.V.	(Montgomery, Hullinger et al. 2011)
miR-214	Kidney	Pro-fibrotic	miRNA inhibition	?	S.C.	(Denby, Ramdas et al. 2013)

^aAbbreviations : LNA: locked nucleic acid; cEt: 2', 4'-constrained 2'O-ethyl

^bAbbreviations : I.V.: intraveinuous; I.P.: Intra-péritoneal; I.T.: intra-tracheal; S.C.: subcutaneous

. En effet, Patrick et ses collaborateurs, ont montré que les souris KO miR-21 étaient tout à fait normales, et en réponse à différents stress développent des troubles cardiaques ainsi qu'une fibrose de manière similaire aux souris contrôles. D'autre part, l'administration de l'inhibiteur LNA-miR-21 n'a pas pu améliorer la fibrose cardiaque chez les souris.

Lors d'une identification de gènes impliqués dans les maladies pulmonaires interstitielles, un autre miRNA, miR-23a a été impliqué dans la régulation de la voie du TGF β . MiR-23a est induit par le TGF β , et son expression induirait une inhibition de Nedd4L une ubiquitine ligase qui peut se lier directement à Smad2/3 pour induire leur dégradation. L'augmentation de l'expression de miR-23a est ainsi responsable de la persistance d'expression de l' α -SMA, induite par une amplification du signal de la voie du TGF β (Cho, Gelinas et al. 2011).

X) MiARN et thérapies

Durant ces dix dernières années, des progrès conséquents ont été réalisés au niveau de la compréhension des mécanismes d'action des miARN, et ceci dans différentes pathologies. Ces nouvelles découvertes ouvrent la porte à de multiples stratégies thérapeutiques innovantes et représentent un grand intérêt pour l'industrie pharmaceutique. De façon remarquable, il n'aura fallu que dix ans pour que l'inhibiteur de miR-122, le miravirsén, soit déjà en cours d'essai clinique de phase II pour le traitement de patients atteints du virus de l'hépatite C (Janssen, Reesink et al. 2013).

Comme nous l'avons vu précédemment, de nombreuses études montrent que les miARN sont dérégulés durant le processus de fibrose dans différents tissus, et que la modulation de leur expression *in vivo* dans différents modèles pré-cliniques peut améliorer l'état pathologique (**Tableau 3**). L'intérêt de cibler ces « fibromiRs » apparaît donc comme de nouvelles stratégies thérapeutiques prometteuses. Il existe trois stratégies thérapeutiques selon le sens de la modulation de l'expression du miARN et l'importance de leur(s) cible(s) : (i) **Le remplacement** d'un miARN lorsqu'il est sous exprimé durant la pathologie ; (ii) **l'inhibition** de son expression, lorsqu'il est sur-exprimé ; (iii) l'utilisation d'un « **Target site blocker** », permettant de protéger la cible d'un miARN associée à la pathologie.

1) La stratégie thérapeutique du remplacement du miARN

Cette stratégie thérapeutique est similaire à la thérapie génique, visant à remplacer ou compléter le manque du gène d'intérêt. Cependant, le faible poids moléculaire des miARN permet leur utilisation sous forme d'oligonucléotides synthétiques, et ne nécessite pas l'utilisation de vecteurs viraux comme dans le cas de la thérapie génique. Ainsi, l'administration de miARN synthétique par voie systémique a déjà fait ses preuves lors

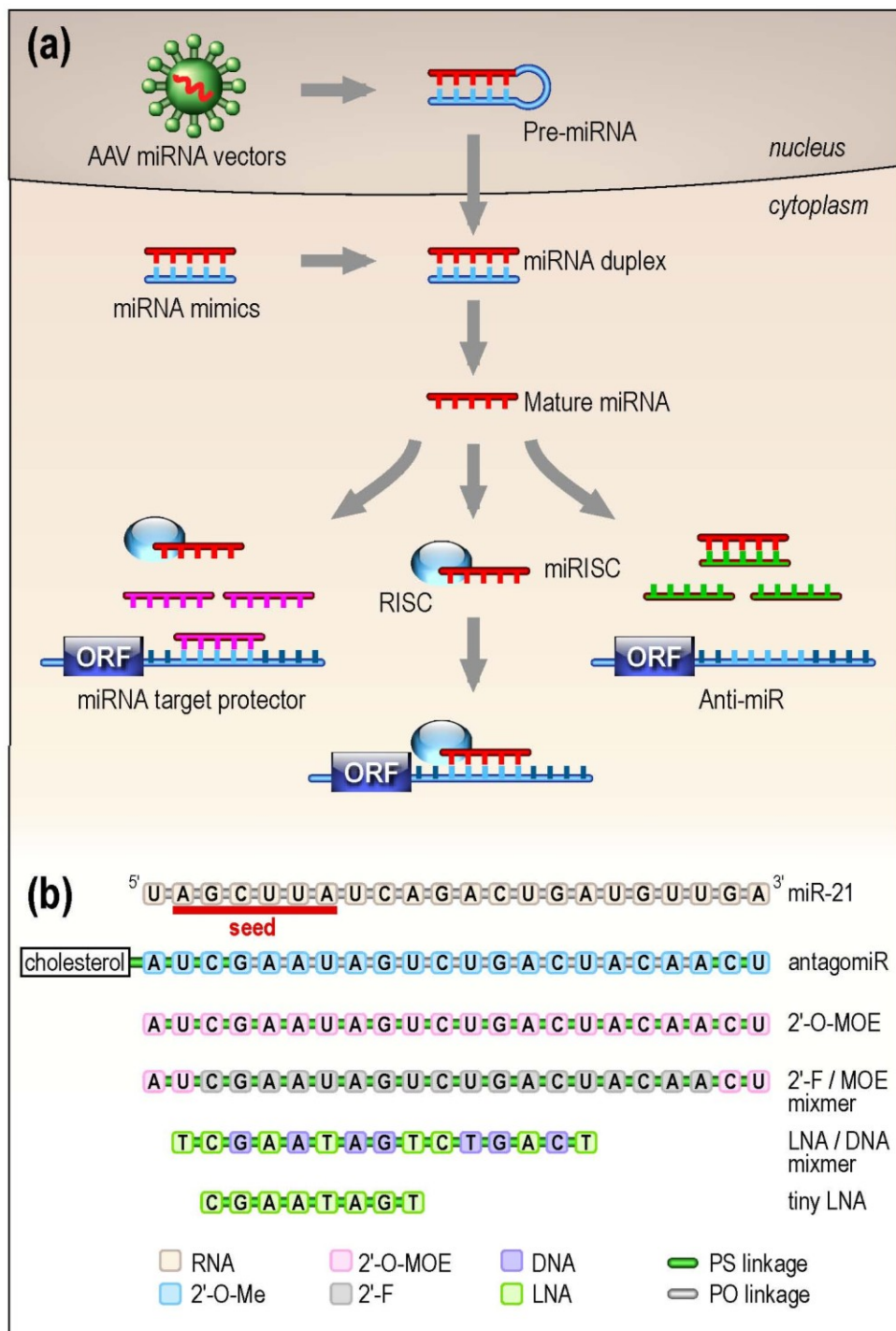


Figure 23 : Exemples d'outils thérapeutiques pour le contrôle de la régulation de gènes par les miARN. A) En fonction du type de « fibromiRs » et de leurs niveaux d'expression dans les tissus fibrotiques, deux types de stratégies peuvent être mises en place : une approche permettant d'inhiber les miARN pro-fibrotiques et une approche basée sur la surexpression des miARN anti-fibrotiques. L'inhibition des miARN peut être réalisée à l'aide d'anti-miRs (oligonucléotides antisens ciblant directement le miRNA) ou de Target site blockers (oligonucléotides se fixant sur l'ARNm cible en compétition avec le miR). Les stratégies de surexpression des miARN reposent sur l'utilisation de miARN mimics ou d'adénovirus AAV. B) **Exemple de modifications chimiques des différents inhibiteurs de miR-21.** Les antagomiRs 2'-O-Me possèdent un groupement cholestérol en plus pour augmenter l'absorption tissulaire et cellulaire. Les tinyLNA sont conçus pour inhiber toute une famille de miARN partageant la même « région seed ».

ORF (Open Reading Frame), **RISC** (RNA-Induced Silencing Complex), **2'-O-Me** (2'-O-methyl), **2'-MOE** (2'-O-methoxyethyl), **2'-F** (2'-Fluoro), **LNA** (Locked Nucleic Acid), **PO** (Phosphodiester), **PS** (Phosphorothioate).

d'essais précliniques (**Tableau 3**). On peut notamment citer l'administration de miR-29b, qui prévient le développement de la fibrose induite par la bléomycine chez la souris (Xiao, Meng et al. 2012).

Bien que prometteuse, cette stratégie fait face à de nombreux défis concernant les modifications chimiques utilisées, qui peuvent modifier la cinétique d'hybridation et la température de fusion des oligonucléotides et donc influencer sur l'activité du miARN synthétique. L'autre alternative, qui permettrait d'éviter ce biais repose sur l'utilisation d'approches de thérapie génique utilisant notamment des adénovirus AAV (Adeno-Associated Viruses), qui ont la particularité d'être très peu toxiques et ne s'intègrent pas au génome (**figure 23A**) (Michelfelder and Trepel 2009 ; van Rooij, Purcell et al. 2012). Une grande variété d'AAV modifiés est aujourd'hui disponible, ce qui permet une spécificité tissulaire selon le sérotype utilisé (Michelfelder and Trepel 2009).

2) La stratégie thérapeutique d'inhibition du miARN

Cette stratégie contrairement à la précédente, vise à inhiber l'expression d'un miARN qui est anormalement sur-exprimé dans la pathologie. Le concept est simple et a déjà prouvé son efficacité (Janssen, Reesink et al. 2013), via l'utilisation d'oligonucléotides chimiquement modifiés, complémentaires au miARN d'intérêt ce qui va permettre de séquestrer le miARN mature dans une configuration qui empêche sa prise en charge par le complexe RISC. Les inhibiteurs de miARN les plus utilisés sont des petits oligonucléotides simples brin modifiés chimiquement. En effet, les liaisons phosphodiester des acides nucléiques ADN ou ARN sont les cibles des nucléases ubiquitaires, faisant ainsi des acides nucléiques des molécules instables dans les systèmes biologiques. De plus, ils ont un mauvais profil pharmacocinétique, ce qui exclut leur administration systémique. En effet, les acides nucléiques non modifiés se lient faiblement aux protéines plasmatiques et sont rapidement filtrés par les reins et éliminés dans les urines. Enfin, leur faible spécificité et leur faible affinité de liaison représente une autre limite technique qui doit être corrigée pour les utiliser à des fins thérapeutiques. Ainsi, le développement de molécules thérapeutiques actives qui peuvent mimer ou bien se lier spécifiquement aux miARN pour les inhiber, nécessite une optimisation de la structure chimique des oligonucléotides de manière à obtenir des propriétés pharmacologiques et pharmacocinétiques plus favorables. En ce sens, de nombreuses modifications chimiques tant au niveau des sucres qu'au niveau des liaisons inter-nucléotidiques (backbone) ont été développées permettant d'améliorer leur spécificité, leur affinité ou encore leur résistance aux nucléases (**figure 23B et 24**). Les inhibiteurs de miARN vont s'apparier directement au

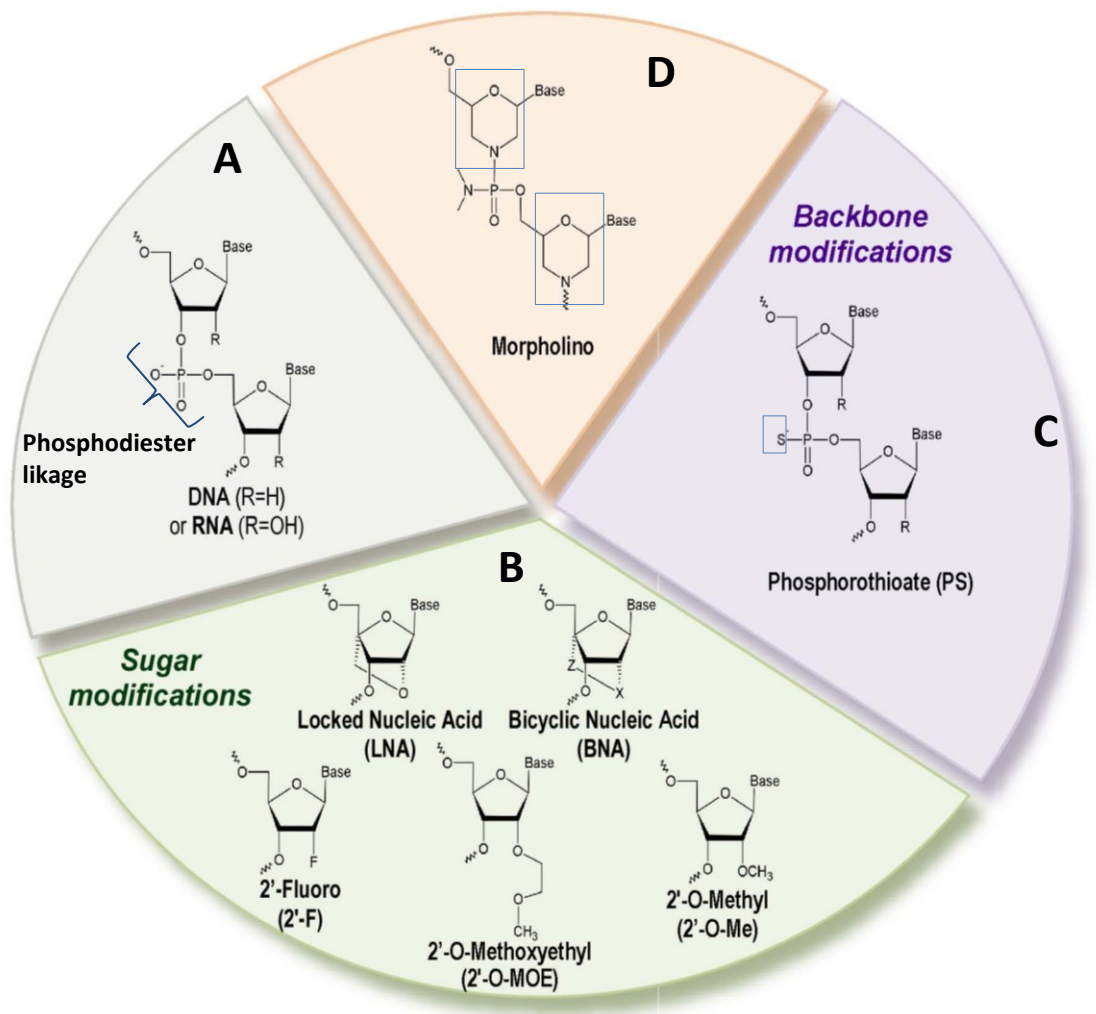


Figure 24 : Les différentes modifications chimiques des inhibiteurs de miARN comme outils thérapeutiques.

A) Les acides nucléiques non modifiés.

B) La modification en position 2' du sucre est une stratégie qui a fait ses preuves pour **augmenter l'affinité et la spécificité** ainsi que la **résistance aux nucléases** en augmentant l'encombrement stérique due à la proximité 2' avec le 3'-phosphate. Parmi ces modifications chimiques, on retrouve les groupements 2'-O-methyl (2'-O-Me), 2'-fluoro (2'-F), 2'-O-methoxyethyl (2'-O-MOE) ou encore des sucres 2', 4' bicyclique comme les Locked Nucleic Acid (LNA) qui permettent d'obtenir des meilleures propriétés que les modifications en 2' uniquement.

C) La modification chimique de la liaison phosphodiester est la plus couramment utilisée (phosphorothioate, PS). La substitution de l'oxygène par le soufre **augmente la résistance aux nucléases** et leur confère également de **meilleures propriétés pharmacocinétiques** en augmentant leurs liaisons aux protéines plasmatiques, ce qui diminue leur clairance rénale.

D) La modification chimique des oligonucléotides morpholinos consiste à remplacer le sucre par un cycle à six sous-unités morpholines, ce qui leur confère une bonne résistance aux nucléases.

miARN d'intérêt avec une forte affinité, l'empêchant ainsi d'interagir avec ses cibles (Obad, dos Santos et al. 2011).

3) La stratégie thérapeutique de protection de la cible du miARN

Les « **Target Sites blockers** » ou TSBs émergent comme de nouveaux outils innovants. Ce sont des oligonucléotides simple brin modifiés chimiquement. Ces derniers vont entrer en compétition avec le miARN d'intérêt, et se fixent de manière parfaitement complémentaire au niveau de la région 3'UTR de l'ARNm cible (**figure 23A**). Ceci va empêcher le miARN de déstabiliser sa cible, et ainsi restaure l'expression physiologique de sa protéine. Leur utilisation permet un meilleur contrôle de spécificité étant donné qu'un miARN peut avoir plus de 300 cibles potentielles. La première étude montrant l'efficacité de cet outil *in vivo* n'est apparu que récemment. L'équipe de Tao Sun a utilisé un vecteur exprimant des séquences d'oligonucléotides de taille différente (20, 40 et 60 nucléotides), parfaitement complémentaires au site de fixation du « miR-19a » sur le 3'UTR de l'ARNm « Pten ». Les conclusions de l'étude indiquent que les TSBs de 60nt sont les plus efficaces pour empêcher la répression de Pten au cours du développement du cortex chez la souris (Knauss, Bian et al. 2013).

XI) Conclusion

La possibilité de pouvoir contrôler une voie de signalisation en modifiant de manière simple l'expression d'un ou plusieurs miARNs, est tout à fait séduisante. Ainsi l'émergence rapide de ces différents outils thérapeutiques pour le contrôle des miARN, semblent prometteuse, ouvrant la voie à de nouvelles molécules, probablement sur le marché d'ici quelques années.

Toutefois, les études sur les miARN dérégulés dans la fibrose pulmonaire idiopathique, sont encore trop préliminaires et nécessitent une compréhension plus approfondie, notamment concernant les étapes de différenciation des fibroblastes en myofibroblastes.

PRESENTATION ET OBJECTIFS DU PROJET

Comme décrit dans la partie introductive, la FPI est une maladie fibroproliférative de très mauvais pronostic, pour laquelle aucun traitement efficace n'existe à ce jour. L'émergence des miARN comme de nouveaux acteurs impliqués dans différents processus pathologiques, ouvre la voie à de nouvelles perspectives thérapeutiques. Cependant, leur contribution dans la fibrose pulmonaire idiopathique reste peu comprise.

L'objectif général du projet a été d'identifier et de comprendre le rôle de certains miARN impliqués dans le processus de fibrose, en particulier sous le contrôle de la voie du TGF- β . Avant mon arrivée au laboratoire, des approches expérimentales à l'aide de biopuces à ADN avaient permis d'identifier et de sélectionner plusieurs miARN candidats impliqués dans plusieurs pathologies fibrotiques. La stratégie était de rechercher des miARN impliqués dans des mécanismes communs à différents types de fibroses. Dans un premier temps, l'analyse des miARN dérégulés a été établie à partir d'échantillons d'ARN pulmonaires provenant de deux souches de souris connues pour être résistantes (BALB/C) ou bien sensibles (C57BL/6) à la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine. A la suite de cette expérience, la comparaison des profils d'expression de miARN a été élargie à deux autres modèles murins de fibrose, à savoir la fibrose rénale induite par obstruction urétérale unilatérale, et la fibrose hépatique induite par administration de tétrachlorure de carbone mais aussi par ligature du conduit biliaire. Ce criblage nous a conduit à choisir miR-199a-5p comme premier candidat de part i) sa relevance statistique, ii) son potentiel discriminant la sensibilité à la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine, mais aussi iii) sa dérégulation dans deux autres modèles de fibrose.

Pour cette étude nous nous sommes ensuite fixé **les objectifs** suivants :

- 1) Validation à la fois *in vitro* et *in vivo*, dans des modèles murins et dans des échantillons provenant de patients atteints de FPI, de la dérégulation de miR-199a-5p
- 2) Caractérisation des mécanismes moléculaires contrôlant l'expression de miR-199a-5p
- 3) Identification et validation de cibles de miR-199a-5p ayant une relevance dans la fibrose pulmonaire idiopathique

Etude des conséquences fonctionnelles liées à un gain (surexpression) ou une perte de fonction (inhibition) du miARN ou de ses cibles ARNm *in vitro*

Ces travaux ont permis la réalisation d'un article paru dans *Plos Genetics*, ainsi qu'une revue parue dans *Médecine et Science*.

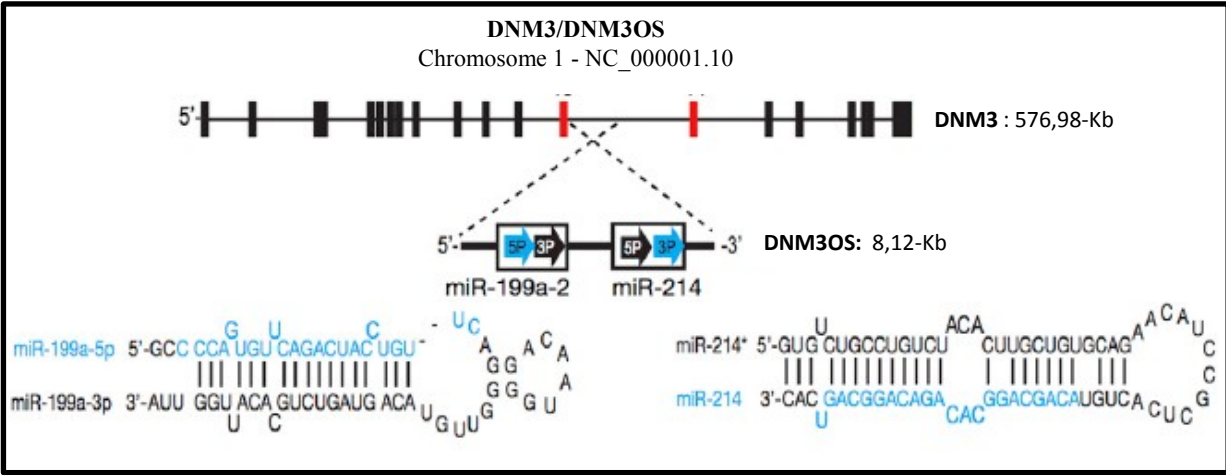
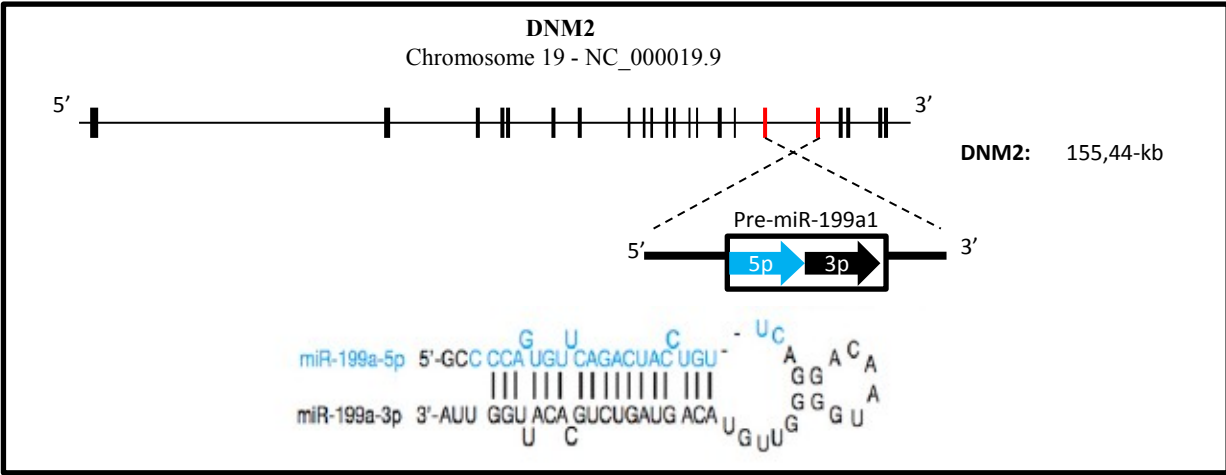
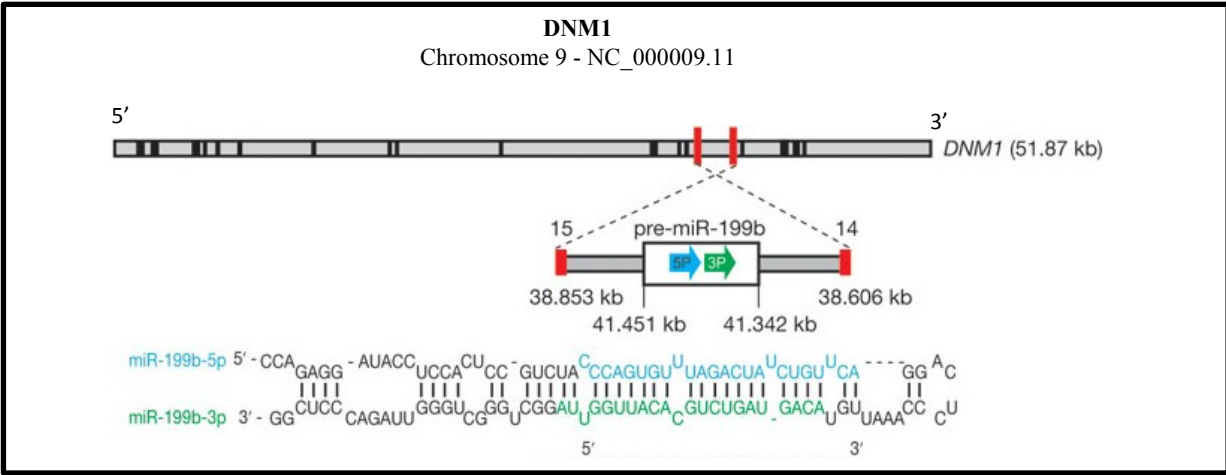


Figure 25: Localisation génomique de miR-199a. Pré-miR-199a-1, Pré-miR-199a-2 et Pré- miR-199b sont transcrits par le brin antisens des gènes codants pour les dynamines (**DNM2**, **DNM3** et **DNM1**). Le transcrit non codant **DNM3OS** (Dynamin3 Opposite Strand), code pour le cluster miR-199a2~214.

- 4) Evaluation du potentiel thérapeutique d'un inhibiteur de miR-199a-5p dans le modèle de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine.

Ces travaux préliminaires non publiés ont été réalisés il y a quelques mois, avec l'aide d'un étudiant en master (M2), Matthieu Buscot et seront présentés sous la forme d'une courte section de résultats après la présentation des articles.

Présentation de la famille miR-199

La famille miR-199 comprend trois transcrits introniques : miR-199a-1, miR-199a-2 et miR-199b qui sont transcrits respectivement par le brin antisens des gènes codants pour les dynamines (DNM2, DNM3 et DNM1) (Small, Frost et al. 2010) (**figure 25**).

MiR-199a-2 est contenu dans le transcrit non codant DNM3OS (Dynamamin3 Opposite Strand) phylogénétiquement conservé, qui code pour le cluster miR-199~214 et semble avoir un rôle important dans le développement embryonnaire (Watanabe, Sato et al. 2008 ; Lee, Bantounas et al. 2009 ; Yin, Chen et al. 2010).

Les DNMs sont des protéines membre du groupe des GTPases qui conservent une grande homologie de séquences dans leurs régions N-terminale et participent à la formation et au maintien de la structure des vésicules membranaires riches en chlatrine (Diatloff-Zito, Gordon et al. 1995 ; Orth and McNiven 2003 ; Koutsopoulos, Kretz et al. 2013).

DNM2 et DNM3 sont exprimées de manière ubiquitaire, alors que DNM1 est exprimée uniquement dans le cerveau, où elle joue un rôle essentiel dans l'endocytose au niveau des synapses du system nerveux central (Yamashita, Hige et al. 2005). Cependant, il n y a pas de corrélation entre l'expression des DNMs et la famille miR-199. La famille miR-199 pourrait donc être sous le contrôle de promoteurs indépendants (prière de se référer au paragraphe 1 de la discussion) (Gu and Chan 2012). Dans cette étude, nous nous sommes principalement intéressés à miR-199a-5p qui est transcrit par le pri-miR-199a-1et/2.

PRINCIPAUX RESULTATS PUBLIES

« La théorie, c'est quand on sait tout mais que rien ne fonctionne. La pratique, c'est quand tout fonctionne mais que personne ne sait pourquoi. » Albert Einstein

I) Article

MiR-199a-5p Is Upregulated during Fibrogenic Response to Tissue Injury and Mediates TGFbeta-Induced Lung Fibroblast Activation by Targeting Caveolin-1

Dans cette étude, nous avons montré que **miR-199a-5p était surexprimé dans les échantillons de** (i) poumons de souris instillées à la bléomycine et (ii) de **biopsies pulmonaires** de patients atteints de FPI. Les mesures d'expression ont été réalisées par puces à ADN et PCR-quantitative. De plus, des expériences d'hybridation *in situ* ont permis de mettre en évidence que miR-199a-5p était localisé dans les foyers fibroblastiques, exprimant fortement l' α -SMA..

La recherche de cibles a été effectuée par une combinaison d'approches expérimentales et computationnelles, à l'aide d'une méthode mise en place dans notre équipe (Le brigand et al. 2010). Nous avons ainsi montré que **miR-199a-5p était responsable de la diminution d'expression de CAV-1 induite par le TGF- β à la fois *in vitro* et *in vivo*** chez la souris et l'homme. Afin de comprendre l'impact fonctionnel de l'inhibition de CAV1 par miR-199a-5p, nous avons effectué des études de gain et de perte de fonction, ce qui nous a permis de montrer que **miR-199a-5p était un effecteur important du TGF- β dans la différenciation des myofibroblastes**, constituant une boucle de rétrocontrôle positif responsable de l'exacerbation de la voie du TGF- β .

miR-199a-5p Is Upregulated during Fibrogenic Response to Tissue Injury and Mediates TGFbeta-Induced Lung Fibroblast Activation by Targeting Caveolin-1

Christian Lacks Lino Cardenas^{1,9}, Imène Sarah Henaoui^{2,3,9}, Elisabeth Courcot¹, Christoph Roderburg⁴, Christelle Cauffiez¹, Sébastien Aubert^{5,6,7}, Marie-Christine Copin^{5,6,7}, Benoit Wallaert⁸, François Glowacki¹, Edmone Dewaeles¹, Jadranka Milosevic⁹, Julien Maurizio^{2,3}, John Tedrow⁹, Brice Marcet^{2,3}, Jean-Marc Lo-Guidice¹, Naftali Kaminski⁹, Pascal Barbry^{2,3}, Tom Luedde⁴, Michael Perrais^{5,7}, Bernard Mari^{2,3,9*}, Nicolas Pottier^{1,9*}

1 EA4483, Faculté de Médecine de Lille, Pole Recherche, Lille, France, **2** Centre National de la Recherche Scientifique, Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, UMR-7275, Valbonne Sophia-Antipolis, France, **3** Université de Nice Sophia-Antipolis, Nice, France, **4** Department of Medicine III, University Hospital RWTH Aachen, Aachen, Germany, **5** Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U837, Jean-Pierre Aubert Research Center, Equipe 5 "Mucines, Différentiation et Cancérogenèse Épithéliales", Lille, France, **6** Pôle de Pathologie, CHRU Lille, Lille, France, **7** Faculté de Médecine, Université de Lille 2, Lille, France, **8** Service de Pneumologie et Immunoallergologie, CHRU Lille, Lille, France, **9** Dorothy P. and Richard P. Simmons Center for Interstitial Lung Disease, Division of Pulmonary, Allergy, and Critical Care Medicine, University of Pittsburgh School of Medicine, Pittsburgh, Pennsylvania, United States of America

Abstract

As miRNAs are associated with normal cellular processes, deregulation of miRNAs is thought to play a causative role in many complex diseases. Nevertheless, the precise contribution of miRNAs in fibrotic lung diseases, especially the idiopathic form (IPF), remains poorly understood. Given the poor response rate of IPF patients to current therapy, new insights into the pathogenic mechanisms controlling lung fibroblasts activation, the key cell type driving the fibrogenic process, are essential to develop new therapeutic strategies for this devastating disease. To identify miRNAs with potential roles in lung fibrogenesis, we performed a genome-wide assessment of miRNA expression in lungs from two different mouse strains known for their distinct susceptibility to develop lung fibrosis after bleomycin exposure. This led to the identification of miR-199a-5p as the best miRNA candidate associated with bleomycin response. Importantly, miR-199a-5p pulmonary expression was also significantly increased in IPF patients (94 IPF versus 83 controls). In particular, levels of miR-199a-5p were selectively increased in myofibroblasts from injured mouse lungs and fibroblastic foci, a histologic feature associated with IPF. Therefore, miR-199a-5p profibrotic effects were further investigated in cultured lung fibroblasts: miR-199a-5p expression was induced upon TGFβ exposure, and ectopic expression of miR-199a-5p was sufficient to promote the pathogenic activation of pulmonary fibroblasts including proliferation, migration, invasion, and differentiation into myofibroblasts. In addition, we demonstrated that miR-199a-5p is a key effector of TGFβ signaling in lung fibroblasts by regulating CAV1, a critical mediator of pulmonary fibrosis. Remarkably, aberrant expression of miR-199a-5p was also found in unilateral ureteral obstruction mouse model of kidney fibrosis, as well as in both bile duct ligation and CCl₄-induced mouse models of liver fibrosis, suggesting that dysregulation of miR-199a-5p represents a general mechanism contributing to the fibrotic process. MiR-199a-5p thus behaves as a major regulator of tissue fibrosis with therapeutic potency to treat fibroproliferative diseases.

Citation: Lino Cardenas CL, Henaoui IS, Courcot E, Roderburg C, Cauffiez C, et al. (2013) miR-199a-5p Is Upregulated during Fibrogenic Response to Tissue Injury and Mediates TGFbeta-Induced Lung Fibroblast Activation by Targeting Caveolin-1. PLoS Genet 9(2): e1003291. doi:10.1371/journal.pgen.1003291

Editor: Hamish S. Scott, Centre for Cancer Biology, SA Pathology, Australia

Received: March 6, 2012; **Accepted:** December 16, 2012; **Published:** February 14, 2013

Copyright: © 2013 Lino Cardenas et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported in part by the following grants: Fondation pour la Recherche Médicale Région Nord-Pas-de-Calais (N Pottier), Comité du Nord de la Ligue Nationale contre le Cancer (N Pottier), Conseil Régional du Nord Pas de Calais (N Pottier, C Cauffiez, J-M Lo-Guidice), ANR-09-JCJC-0002 (M Perrais, P Barbry), ARC grant SFI20101201798 (P Barbry, B Mari), IRENI (J-M Lo-Guidice), European Union Research Framework Programme 7, project HEALTH-2007-201279/Microenvimet (P Barbry, B Mari), and NIH grants (RO1HL095397, RC2HL101715, and RO1LM009657) (N Kaminski, J Tedrow, J Milosevic). IS Henaoui is a recipient of a doctoral fellowship from the "région PACA" (bourse Région-Entreprise). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: N Kaminski has a patent application for use of microRNAs as therapeutic targets in Idiopathic Pulmonary Fibrosis.

* E-mail: nico_pottier@yahoo.fr (N Pottier); mari@unice.fr (B Mari)

These authors contributed equally to this work.

Introduction

Tissue fibrosis, defined as the excessive and persistent formation of non functional scar tissue in response to repeated injury and insult, is a leading cause of morbidity and mortality associated with organ failure in various chronic diseases such as those affecting the

lung interstitium [1]. Among the interstitial lung diseases of unknown etiology, Idiopathic Pulmonary Fibrosis (IPF) is the most common and lethal with a median survival of 3 to 5 years after diagnosis [2]. The pathogenesis of IPF is complex and largely unknown [2], but observations based on both animal models of pulmonary fibrosis and lung sections from patients with IPF

Author Summary

Fibrosis is the final common pathway in virtually all forms of chronic organ failure, including lung, liver, and kidney, and is a leading cause of morbidity and mortality worldwide. Fibrosis results from the excessive activity of fibroblasts, in particular a differentiated form known as myofibroblast that is responsible for the excessive and persistent accumulation of scar tissue and ultimately organ failure. Idiopathic Lung Fibrosis (IPF) is a chronic and often rapidly fatal pulmonary disorder of unknown origin characterized by fibrosis of the supporting framework (interstitium) of the lungs. Given the poor prognosis of IPF patients, new insights into the biology of (myo)fibroblasts is of major interest to develop new therapeutics aimed at reducing (myo)fibroblast activity to slow or even reverse disease progression, thereby preserving organ function and prolonging life. MicroRNAs (miRNAs), a class of non-coding RNA recently identified, are associated with normal cellular processes; and deregulation of miRNAs plays a causative role in a vast array of complex diseases. In this study, we identified a particular miRNA: miR-199a-5p that governs lung fibroblast activation and ultimately lung fibrosis. Overall we showed that miR-199a-5p is a major regulator of fibrosis with strong therapeutic potency to treat fibroproliferative diseases such as IPF.

suggest a dynamic pathobiological process involving excessive wound healing with chronic inflammation, apoptosis of epithelial and endothelial cells, mesenchymal cell proliferation and activation with the formation of fibroblasts/myofibroblasts foci, and finally excessive deposition of extracellular matrix resulting in the destruction of the lung architecture and the loss of lung functions [2]. In particular, myofibroblasts play a substantial role in IPF by secreting important amount of ECM components and by promoting lung tissue stiffening [3]. Given the poor response rate of IPF patients to current therapy, a detailed understanding of the underlying pathogenic mechanisms is of major interest to develop new effective therapeutic strategies targeting the cellular and molecular events involved in the fibrotic response.

MicroRNAs (miRNAs) are a class of noncoding small RNA, which most often bind to the 3' UTR of target genes mRNAs and thereby repress their translation and/or induce their degradation. Since the first miRNA identification in *Caenorhabditis elegans* in a context of larval development [4,5], thousands miRNAs have now been characterized including about 2000 in human (miRbase v19) [6]. MiRNAs are now recognized as major regulators of gene expression with crucial functions in numerous biological processes including development, proliferation, differentiation, apoptosis and stress response. Importantly, recent studies have identified specific miRNA expression patterns related to the initiation and progression of various diseases including cancer as well as inflammatory, infectious and autoimmune diseases [7–9]. Additionally, gain and loss of function miRNA studies have further established their functional impact in various *in vivo* models [10–15]. Nevertheless, the precise contribution of miRNAs in fibrotic diseases, especially lung fibrosis, is still poorly understood [16,17]. Our rationale was therefore to test whether miRNAs may provide new perspectives on disease mechanisms, diagnosis as well as new therapeutic opportunities in the specific context of fibrosis.

In an effort to identify miRNAs with potential roles in the development of lung fibrosis (strategy detailed in Figure S1), we aimed to identify miRNAs of interest in two mouse strains showing different susceptibility to develop lung fibrosis after bleomycin exposure. This led to the identification of a panel of miRNAs

specifically dysregulated in the lungs of fibrosis prone mouse strain in response to bleomycin. Among these miRNAs, miR-199a-5p was found to be selectively up-regulated in myofibroblasts of the injured lung in bleomycin-treated mice and fibroblastic foci of IPF patients. In lung fibroblasts, miR-199a-5p acts as an effector of TGF β signaling, regulates CAV1 expression, a critical mediator of the lung fibrosis process [18–21] and participates to multiple fibrogenic associated-processes including cell proliferation, migration, invasion and differentiation into myofibroblasts. Finally, dysregulation of miR-199a-5p was also found in two other mouse models of tissue fibrosis, namely kidney fibrosis and liver fibrosis, suggesting therefore that miR-199a-5p is likely to be a common mediator of fibrosis.

Results

Fibrosis-sensitive and -resistant mice exhibit a distinct miRNA expression profile in response to bleomycin

Previous studies based on mice have demonstrated a genetic susceptibility to bleomycin-induced pulmonary fibrosis [22,23]. Indeed, C57BL/6 mice are considered to be fibrosis prone, whereas BALB/C mice are less prone to fibrosis. To identify miRNAs that may contribute to the lung fibrosis process, miRNA expression profile in response to bleomycin was assessed 7 days and 14 days following bleomycin administration (*i.e.* when active fibrogenesis occurs) on both strains using a microarray based platform (Data set 1, GEO accession number GSE34812) described elsewhere [24–26]. We identified 22 differentially expressed miRNAs between lungs from bleomycin- and control-treated animals in at least one strain, the majority being upregulated in bleomycin-instilled lungs (Figure 1A). We focused our analysis on miRNAs that exhibited an enhanced expression in response to bleomycin during disease progression in the C57BL/6 sensitive mice only. Among several miRNAs candidates with such a profile, miR-199a-5p displayed the highest statistical score (Figure 1B). This was further established using an independent set of mice at day 14 following bleomycin treatment (Figure S2A). These findings strongly suggested that miR-199a-5p may play an important role during the lung fibrosis process. To investigate the regulatory mechanisms underlying miR-199a-5p production, we assessed the expression status of the 2 mouse genes, miR-199a-1 (on chromosome 9) and miR-199a-2 (on chromosome 1) in response to bleomycin using a Taqman assay designed to discriminate between pri-miR-199a-1 and pri-miR-199a-2. Our results showed that, 14 days after bleomycin instillation, both pri-miR-199a transcripts were up-regulated in the lungs of C57BL/6 mice (Figure S2B) and thus, contributed to miR-199a-5p production. In addition, *in situ* hybridization experiments performed in the injured lungs from C57BL/6 mice 14 days after bleomycin instillation revealed a selective expression of miR-199a-5p in myofibroblasts (Figure 1C).

Of note, consistent with previous findings [14], we also found a significant upregulation of miR-21 (now referenced in miRbase as mmu-miR-21a-5p) in response to bleomycin (Figure 1A and Figure S3). Nevertheless, miR-21 induction did not differ between bleomycin-sensitive and bleomycin-resistant strains of mice.

Identification of miR-199a-5p target genes in lung fibroblasts

We next sought to determine the mechanism by which miR-199a-5p dysregulation may lead to tissue fibrosis. To address this question, we first attempted to identify gene targets and cellular pathways regulated by miR-199a-5p using the methodology described earlier [25,26]. The influence of miR-199a-5p on

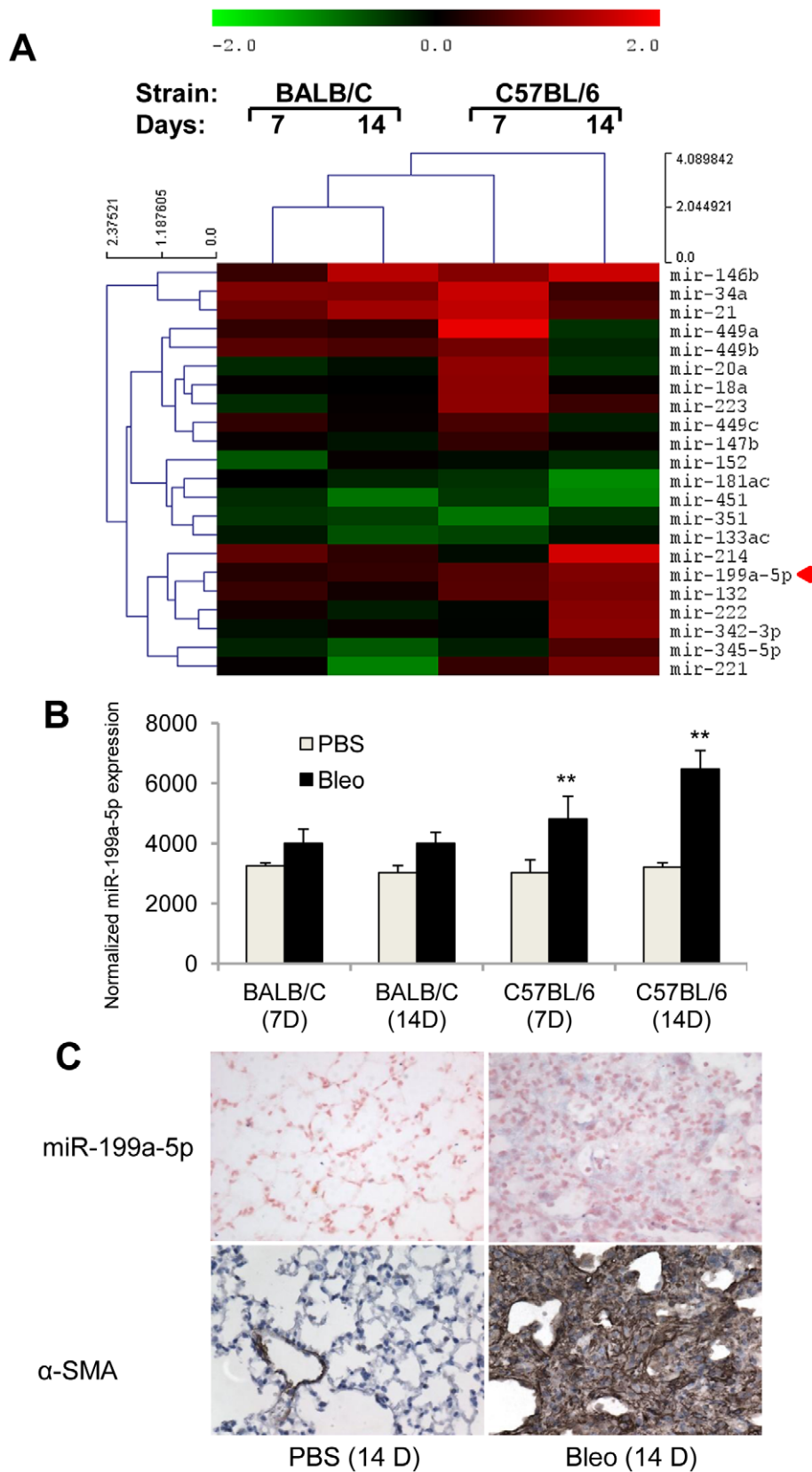


Figure 1. miR-199a-5p expression during bleomycin induced lung fibrosis. (A) Heat map representing the statistically significant (adjusted p -value < 0.05) differentially expressed microRNAs in lungs from BALB/C and C57BL/6 mice in response to bleomycin at the indicated time points. Up-regulated microRNAs are shown in progressively brighter shades of red, depending on the fold difference, and down-regulated microRNAs are shown in progressively brighter shades of green. miR-199a-5p is marked in red. $n = 3$ mice in each group. (B) miR-199a-5p expression in lungs from BALB/C

and C57BL/6 mice in response to bleomycin at the indicated time points. $n = 3$ mice in each group. Data from microarrays experiments are expressed as mean of normalized fluorescence intensity \pm SEM. $**p < 0.01$ (C) Paraffin sections were prepared from lungs of C57BL/6 mice 14 days following bleomycin intra-tracheal instillation. *In situ* hybridization and immunohistochemistry assays were performed to determine the colocalization of miR-199a-5p and α -SMA. Results represent one out of three independently performed experiments.
doi:10.1371/journal.pgen.1003291.g001

human pulmonary hFL1 fibroblast transcriptome was compared with that of miR-21, which has been previously associated with the development of fibrotic diseases including lung fibrosis [14,15,27] (Data set 2, GEO accession number GSE34815). Forty-eight hours after ectopic overexpression of each miRNA, a significant alteration (defined by an absolute \log_2 ratio above 0.7 and an adjusted p -value below 0.05) of 1261 and 753 transcripts was detected in the miR-199a-5p and miR-21 conditions, respectively. While these 2 miRNAs induced very distinct gene expression patterns (Figure 2A), a functional annotation of these signatures, using Ingenuity Pathway software, indicated an overlap for “canonical pathways” including “Cell Cycle regulation” and “TGF β Signaling” (Table S1). Consistent with previous findings [28], highly significant pathways associated with miR-21 were related to “Cyclins and Cell Cycle Regulation” as well as “Cell Cycle Control of Chromosomal Replication”, “Mismatch Repair in Eukaryotes” and “ATM signalling”. While the highest scoring pathway for miR-199a-5p corresponded to the metabolic pathways “Biosynthesis of Steroids”, we also noticed enrichment for pathways related to “Integrin Signaling” and “Caveolar-mediated Endocytosis Signaling”. We next looked for an enrichment of putative direct targets in the population of down-regulated transcripts, as described in [29]. A specific overrepresentation of predicted targets for miR-199a-5p and miR-21 in the population of down-regulated transcripts was noticed after heterologous expression of either miR-199a-5p or miR-21, respectively. This enrichment was independent of the prediction tool used to define the targets (Figure 2B and not shown). We then focussed our analysis on a subset of 21 transcripts containing miR-199a-5p complementary hexamers in their 3'UTR, showing the largest inhibition of expression, and identified by TargetScan, PicTar and miRanda (Figure 2C and Table 1). The gene list of interest was further narrowed by focussing on targets also associated with the most significant canonical pathways described above. Interestingly, the expression levels of 4 out of 21 mouse orthologs were also significantly down-regulated in C57BL/6 mice 14 days after instillation of bleomycin (Data set 3, GEO accession number GSE34814, Table S2). These targets, highlighted in Table 1, are *ARHGAP12*, *CAV1*, *MAP3K11* and *MPP5*. Based on previous studies that demonstrated a significant link between the downregulation of caveolin-1 (CAV1) in lung fibroblasts and the deleterious effects mediated by TGF β [19,30], *CAV1* represented a particularly relevant putative miR-199a-5p target gene.

CAV1 is a *bona fide* miR-199a-5p target

Alignment of miR-199a-5p with human CAV1 3'UTR sequence revealed one potential conserved seed site (Figure 3A). We then fused part of the human CAV1 3'UTR to a luciferase reporter using the psiCHECK-2 vector and transfected it into HEK293 cells in the presence of either a pre-miR-199a-5p mimic or a pre-miR-control (Figure 3B). As a control, we also used a CAV1 3'UTR construct mutated on the predicted miR-199a-5p site. Human pre-miR-199a-5p induced a significant decrease in the normalized luciferase activity relative to control in the presence of the wild type construction only, confirming that it represents a functional site. Moreover, this inhibition was also repeated using the whole 3'-UTR of human CAV1 (Figure S4), demonstrating that *CAV1* is indeed a direct target of miR-199a-5p.

Finally, transfection of pre-miR-199a-5p into MRC-5 and hFL1 lung fibroblasts led to a significant and specific decrease of CAV1 at both mRNA and protein levels while miR-21 had no significant effect (Figure 3C–3E and Figure S5).

miR-199a-5p mediates TGF β -induced downregulation of CAV1 in pulmonary fibroblasts

As TGF β is known to downregulate CAV1 in pulmonary fibroblasts [19], we then investigated whether decreased expression of CAV1 upon TGF β stimulation was associated with an increase in miR-199a-5p expression. We exposed the MRC-5 cell line to TGF β , and analyzed the expression levels of CAV1 and miR-199a-5p. As detected by Taqman RT-PCR, TGF β treatment of human fibroblasts for 24 h or 48 h caused a marked decrease of CAV1 mRNA, whereas miR-199a-5p expression was significantly upregulated (Figure 4A and 4B). Decrease of CAV1 protein levels after TGF β treatment was time dependent (Figure 4C). To further investigate whether miR-199a-5p is involved in TGF β -induced downregulation of CAV1, we performed additional experiments using a LNA-based inhibitor of miR-199a-5p as well as a CAV1 target site blocker to specifically interfere with miR-199a-5p binding on CAV1 3'UTR. As depicted in Figure 4D and S6, both LNA-mediated silencing of miR-199a-5p and blocking miR-199a-5p binding on CAV1 3'UTR inhibit TGF β -induced downregulation of CAV1. Altogether, these experiments demonstrate that, in lung fibroblasts, induction of miR-199a-5p in response to TGF β mediates CAV1 downregulation through binding on a unique site located in CAV1 3'UTR.

Altered expression of CAV1 in the lungs of bleomycin induced pulmonary fibrosis mice

We then assessed the expression of CAV1 in the fibrotic lungs of mice. Consistent with previous studies [19,31], our data showed a significant decrease in both CAV1 mRNA and protein expression levels in C57BL/6 mice 14 days after bleomycin administration (Figure 5A–5C). Additionally, immunohistochemistry staining of CAV1 on lung tissue sections from C57BL/6 mice 14 days after bleomycin treatment revealed a marked reduction of CAV1 in fibrotic area of the lungs (Figure 5D). Taken together, these experiments show that the observed up-regulation of miR-199a-5p expression in the fibrotic lungs of mice is correlated with a downregulation of CAV1. Of note, BALB/c mice, for which pulmonary expression of miR-199a-5p was not upregulated in response to bleomycin, did not display a significant decrease in CAV1 mRNA expression level 14 days after bleomycin treatment (Figure S7).

Concomitant altered expression of both CAV1 and miR-199a-5p in lungs of IPF patients

Expression of miR-199a-5p expression was increased in lungs of IPF patients (GEO accession number GSE13316 from [13]; dataset consisting of ten IPF samples and ten control samples; two different probes for miR-199a-5p with a p -value of $p = 0.005$ and $p = 0.006$, wilcoxon rank sum test, Table S3). This result was confirmed with an independent dataset composed of 94 IPF and 83 control lungs ($p < 0.001$) (Figure 6A) and in an additional cohort using qPCR (Figure S8). As observed in mice, IPF samples also

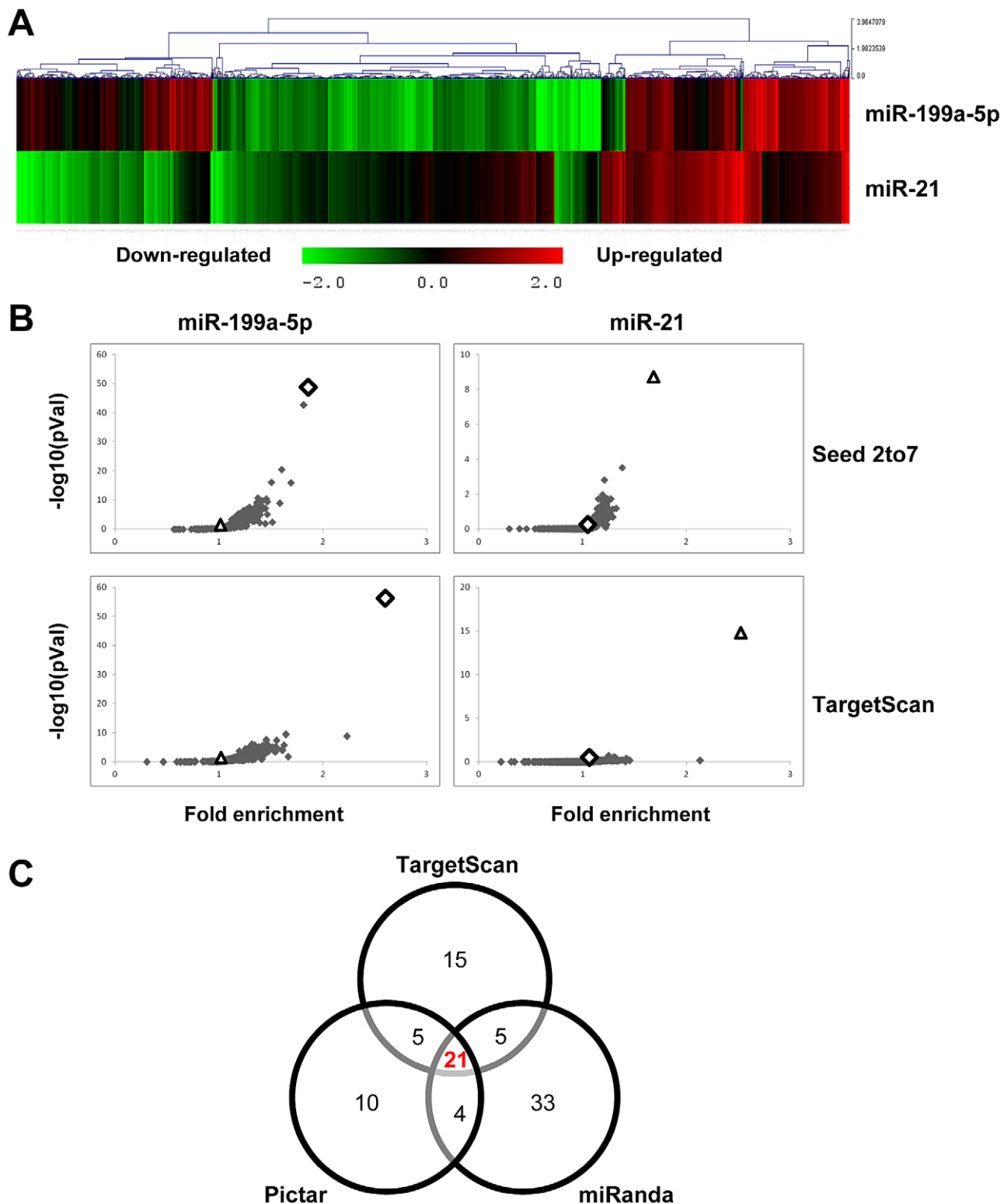


Figure 2. Identification of miR-199a-5p candidate targets using a transcriptomic approach. Normal human pulmonary fibroblasts hFL1 were transfected with pre-miR-Neg, pre-miR-199a-5p or pre-miR-21 ($n=2$). RNA samples were harvested at 48 h post-transfection and expression profiles were determined with pan genomic arrays. (A) Heatmap comparing the normalized \log_2 of the ratios between the signal in the different conditions and the pre-miR-Neg signal. (B) Overrepresentation of miRNA predicted targets in the set of down-regulated transcripts following miR-199a-5p and miR-21 transfection using the webtool miRonTop. Graphs show the significance of the enrichment, represented as $-\log_{10}$ (adjusted p-value), according to the fold enrichment using 2 different prediction tools for all known miRNAs: miR-199a-5p and miR-21 are represented as an open diamond and triangle, respectively. Threshold values used to define the set of up- and down-regulated genes: AveExp = 7.0; log FC = 0.7; adjusted p-value = 0.05. (C) Venn diagram comparing the number of miR-199a-5p targets among the set of highly-downregulated genes following pre-miR-199a-

5p transfection according to 3 distinct target prediction tools. Cut-offs for selection are equal to 7.0 for the \log_2 (signal), to -1.5 for the \log_2 (ratio), and to 0.01 for the adjusted p-value.
doi:10.1371/journal.pgen.1003291.g002

exhibited a significant decrease in CAV1 expression ($p < 0.001$) (Figure 6B). The linear fold ratio for CAV1 between IPF and control was 0.54 ($FDR < 0.05$) and the linear fold ratio for miR-199a-5p for the same subjects was 1.35 ($p < 0.05$). Finally, examination of IPF lung sections revealed a specific expression of miR-199a-5p in fibroblastic foci of the injured lung as well as a decreased CAV1 expression (Figure 6C and 6D).

MiR-199a-5p mediates fibrogenic activation of lung fibroblasts through both CAV1-dependent and -independent pathways

Given that loss of CAV1 expression represents a critical factor involved in the fibrogenic activation of pulmonary fibroblasts [19], we assessed whether overexpression of miR-199a-5p in lung fibroblasts was sufficient to recapitulate known profibrotic effects associated with a decrease in CAV1 expression (i.e. ECM synthesis, fibroblasts proliferation, migration, invasion and differentiation into myofibroblasts) [30,32,33]. Transfection of miR-199a-5p precursors resulted in a significant induction of migration (Figure 7A and 7B) and invasion (Figure 7C). In addition, cell cycle analysis (percent cells in S phase) showed that proliferation rate of pulmonary fibroblasts overexpressing miR-199a-5p was significantly enhanced (Figure 7D). Finally, heterologous expression of miR-199a-5p also led to a strong increase in α smooth muscle actin

(α SMA) expression (Figure 7E and Figure S9), a hallmark of myofibroblast differentiation as well as to a significant potentiation of COL1A1 induction in response to TGF β (Figure 7F).

Comparison of the gene expression profiles obtained in lung fibroblasts transfected with miR-199a-5p precursors or with a siRNA specifically directed against CAV1 revealed an overlap between the 2 signatures, mainly among the down-regulated transcripts (Figure S10A, group 2): 34% of miR-199a-5p downregulated transcripts were also repressed by a siCAV1 (Figure S10B). To gain insights into the pathways modulated by miR-199a-5p, Ingenuity Pathways canonical pathways associated to miR-199a-5p were analyzed and compared to those of miR-21 and siCAV1 conditions. This analysis revealed some proximity between miR-199a-5p and siCAV1 based on the existence of shared regulated pathways (Figure 8A). Pathways that were specific to miR-199a-5p were related to inflammation, such as “IL-1 Signaling”, “Acute Phase Response Signaling” and “P38 MAPK Signaling”, i.e. all typical of fibrotic processes. Importantly, several profibrotic genes were specifically regulated by miR-199a-5p and their altered expression was confirmed *in vivo* (Figure S11 and Table S4). MiR-199a-5p thus regulates multiple signaling pathways involved in lung fibrogenesis. In particular, compared to siCAV1 transfected cells, overexpression of miR-199a-5p significantly increased *CCL2*, *TGFBRI* and *MMP3* expression and

Table 1. List of the main miR-199a-5p predicted targets significantly downregulated following miR-199-5p overexpression in human fibroblasts using the bioinformatics tool miRonTop (<http://www.microarray.fr:8080/miRonTop/index>).

Symbol	Accession Number	Description	Av.Exp ¹	logFC ²
ARHGAP12 ³	NM_018287	Rho GTPase activating protein 12	11.12	-1.96
C17orf63	NM_018182	-	11.90	-1.58
CAV1 ³	NM_001753	Caveolin 1, caveolae protein, 22 kDa (CAV1)	15.28	-1.78
DDR1	NM_013993	Discoidin domain receptor tyrosine kinase 1	9.57	-2.31
EPB41L1	NM_012156	Erythrocyte membrane protein band 4.1-like 1	12.88	-1.94
EXTL3	NM_001440	Exostosin (multiple)-like 3	13.66	-1.20
FZD6	NM_003506	Frizzled homolog 6	11.62	-2.07
IPO8	NM_006390	Importin 8	12.00	-2.09
KLHL3	NM_017415	Kelch-like 3	8.44	-1.32
KPNA4	NM_002268	Karyopherin alpha 4	13.44	-1.11
MAP3K11 ³	NM_002419	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 11	13.11	-2.77
MPP5 ³	NM_022474	Membrane protein, palmitoylated 5	11.76	-1.99
NLK	NM_016231	Nemo-like kinase	11.36	-1.63
PODXL	NM_001018111	Podocalyxin-like (PODXL)	11.21	-2.59
PPP1R2	NM_006241	Protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 2	11.29	-2.50
PXN	NM_002859	Paxillin	14.99	-1.41
RNF11	NM_014372	Ring finger protein 11	14.30	-1.09
ST6GAL1	NM_173216	ST6 beta-galactosamide alpha-2,6-sialyltransferase 1	10.67	-1.70
TAF9B	NM_015975	TAF9B RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor, 31 kDa	9.77	-2.25
VPS26A	NM_004896	Vacuolar protein sorting 26 homolog A	12.37	-1.60
ZNF706	NM_001042510	Zinc finger protein 706	8.15	-1.10

¹logarithm (base 2) of the average intensity (AveExpr).

²logarithm (base 2) of the ratio of miR-199a-5p/miR-Neg (logFC).

³Expression significantly down-regulated in bleomycin-treated C57BL/6 mice.

doi:10.1371/journal.pgen.1003291.t001

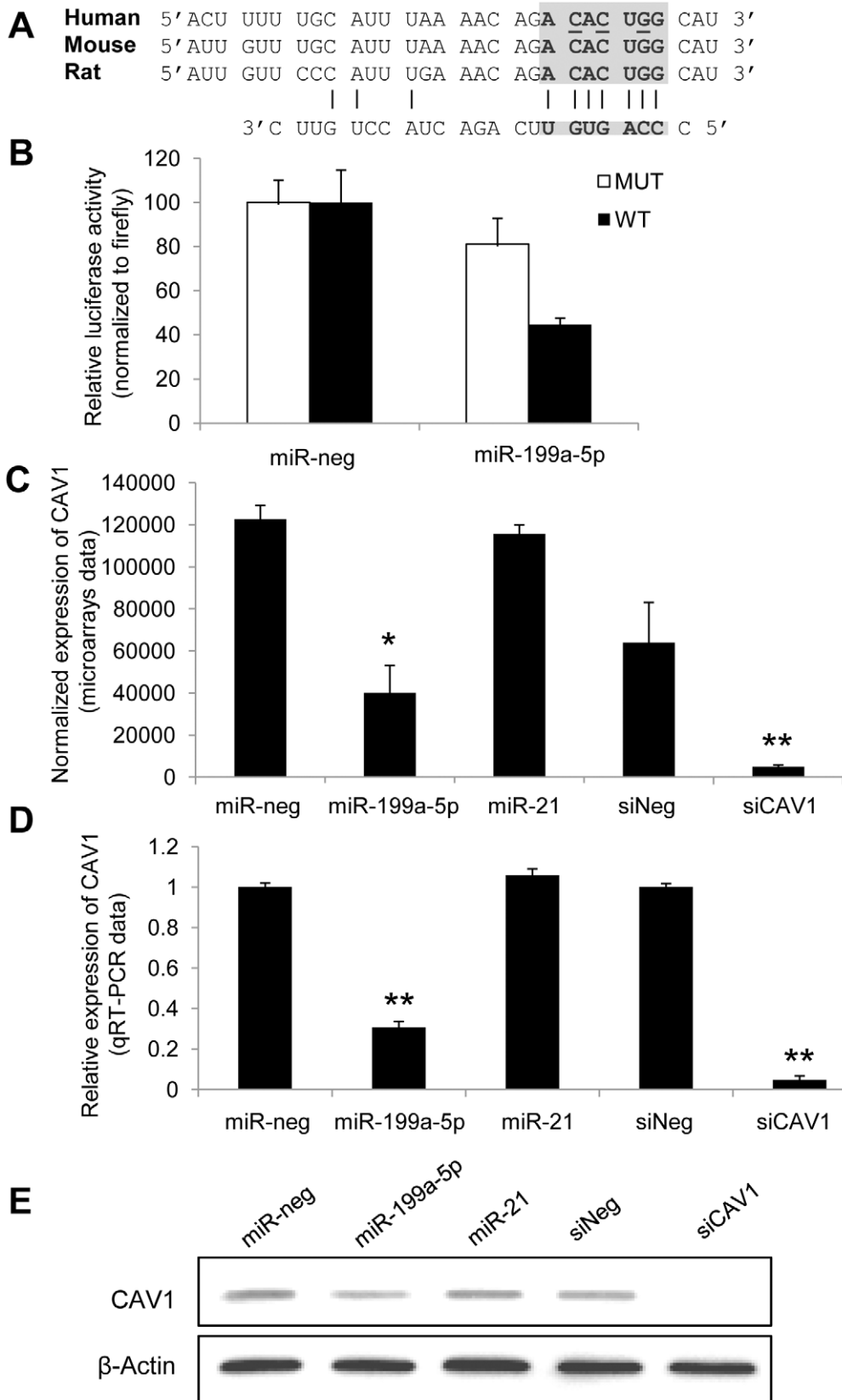


Figure 3. CAV1 is a direct target of miR-199a-5p. (A) Position of miR-199a-5p target site in CAV1 3' UTR and sequence alignment of miR-199a-5p and the CAV1 3' UTR from various species are shown. The "seed" region with a conserved WC match to the eighth nucleotide of the miRNA is highlighted. Bases that have been mutated in the psiCHECK-2 construct are underlined. (B) Co-transfection of pre-miR-199a-5p or pre-miR-Neg and human CAV1 3'UTR-derived psiCHECK-2 construct (wild type or mutated in the putative miR-199a-5p seed region) in HEK293 cells. Cells were

harvested two days after transfection and luciferase activities were analyzed. All renilla luciferase activities were normalized with firefly luciferase activity. * $p < 0.05$. (C) and (D) Normalized expression values of CAV1 in hFL1 lung fibroblasts after transfection with pre-miR-199a-5p, pre-miR-21 or si-CAV1 from microarrays (C, $n = 2$) or real time PCR (D, $n = 3$) experiments. Data are expressed as mean \pm SEM ($n = 2$). ** $p < 0.01$ (E) Western blot analysis showing the down regulated expression of CAV1 protein after transfection of hFL1 lung fibroblasts with pre-miR-199a-5p, pre-miR-21 or si-CAV1. One representative experiment out of two is shown.
doi:10.1371/journal.pgen.1003291.g003

significantly decreased *CAV2* and *PLAU* expression (Figure S12). Of note, these two downregulated genes were predicted to be direct targets of miR-199a-5p by Pictar.

MiR-199a-5p is an effector of TGF β signaling in lung fibroblasts by regulating CAV1

We next investigated whether miR-199a-5p is associated with TGF β signaling. For this, we experimentally defined a TGF β signaling signature in lung fibroblasts (Dataset 2, GSE34815) and compared it to miR-199a-5p signature using gene set enrichment analysis (GSEA) [34]. This analysis revealed a significant overlap between these two signatures, as assessed by normalized enrichment scores above 1 (1.4 and 2.17 for up- and down-regulated genes respectively, with nominal p-value and FDR q-value being < 0.05), suggesting therefore, that miR-199a-5p is involved in the TGF β response of lung fibroblasts (Figure 8B). To further

demonstrate the importance of miR-199a-5p in TGF β response, silencing of miR-199a-5p was performed in lung fibroblasts using LNA-based inhibitors. In particular, we showed that LNA-mediated silencing of miR-199a-5p strongly inhibited TGF β -induced differentiation of lung fibroblasts into myofibroblasts (Figure 8C and Figure S6), SMAD signaling (Figure 8D) and stimulation of wound repair (Figure 8E and 8F). Remarkably, similar results were obtained using CAV1 protector, demonstrating therefore that miR-199a-5p is a key effector of TGF β response through CAV1 regulation (Figure 8C, 8D, 8E, 8F and Figure S6).

MiR-199a-5p is dysregulated in mouse models of kidney and liver fibrosis

A growing body of evidence suggests that miRNAs contribute to the fibrotic process in various organs such as heart, kidneys, liver or lungs. For example, previous reports have shown that miR-21

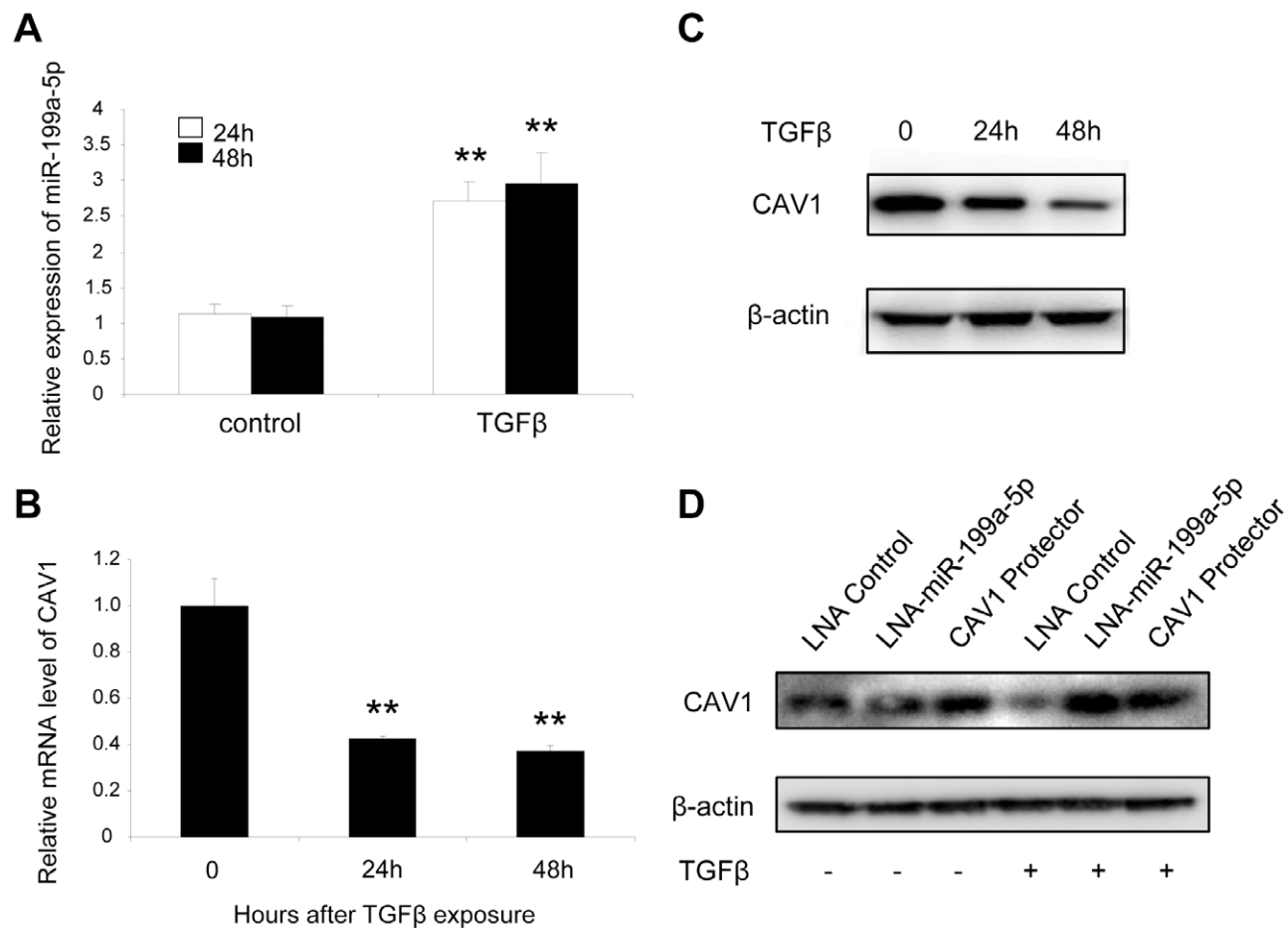


Figure 4. TGF β regulates CAV1 by increasing miR-199a-5p expression. MRC-5 lung fibroblasts were treated with 10 ng/mL TGF β for 24 h and 48 h. MiR-199a-5p (A) and CAV1 expression levels (B) were determined by Taqman PCR. Data are expressed as mean \pm SEM. ** $p < 0.01$. (C) CAV1 protein levels were determined by immunoblot analysis. (D) MRC5 cells were transfected with LNA-miR-199a-5p, CAV1 protector or LNA-control then incubated with or without 10 ng/ml TGF β for 24 h and CAV1 protein levels were determined by immunoblot analysis. Data are representative of three independent experiments.
doi:10.1371/journal.pgen.1003291.g004

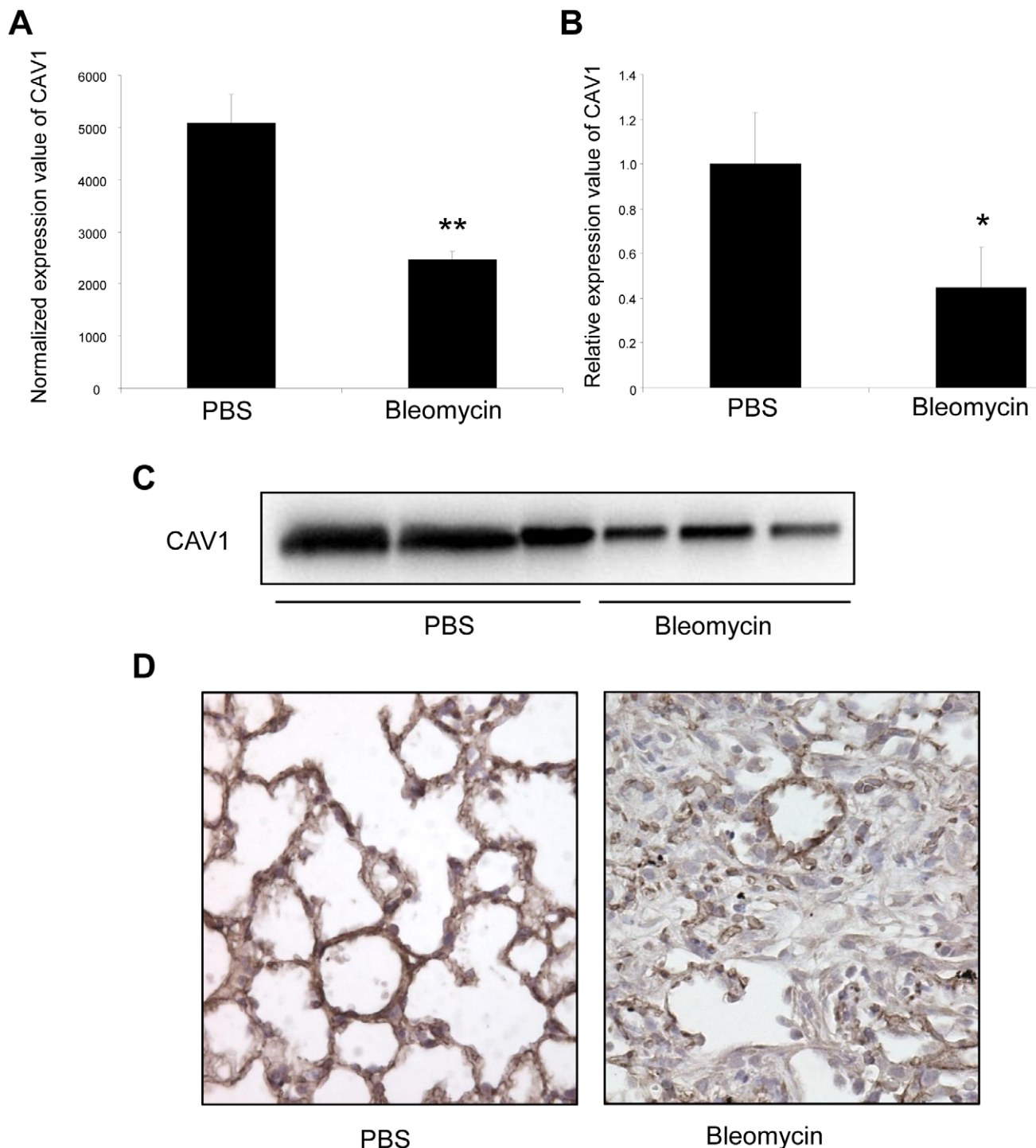
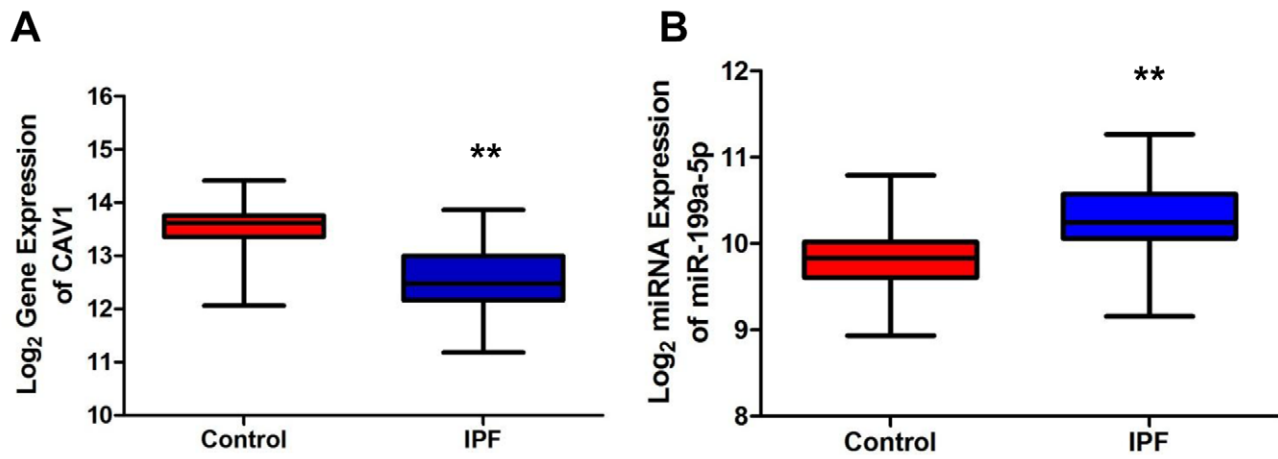


Figure 5. Altered CAV1 expression in bleomycin induced lung fibrosis mouse model. (A) Microarray analysis reveals a significant reduction of CAV1 expression in C57BL/6 mice treated with bleomycin for 14 days compared with control mice. Data are expressed as mean normalized fluorescence values \pm SEM (n = 5). ** p < 0.01. (B) Real-time PCR was performed to confirm the reduced expression of CAV1 in lungs of C57BL/6 mice 14 days following bleomycin exposure. Data are expressed as mean \pm SEM (n = 5). * p < 0.05. (C) CAV1 protein expression as detected by immunoblot analysis in lung tissue samples from C57BL/6 mice treated with bleomycin for 14 days and control mice (n = 3). (D) Immunohistochemical analysis of CAV1 expression in lung tissue sections from C57BL/6 mice 14 days after bleomycin intra-tracheal instillation. One representative section out of three is shown.

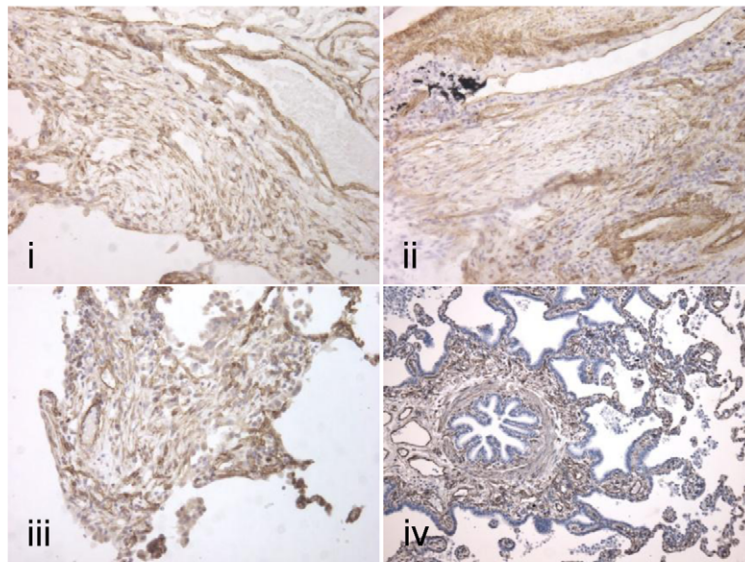
doi:10.1371/journal.pgen.1003291.g005

has an important role in both pulmonary and heart fibrosis experimental mouse models. Thus, we investigated whether miR-199a-5p was also dysregulated in other fibrotic tissues, namely

kidney fibrosis and liver fibrosis. To this end, we assessed the overlap between the miRNA expression profiles corresponding to three experimental models of fibrosis. Measurements were made



C



D

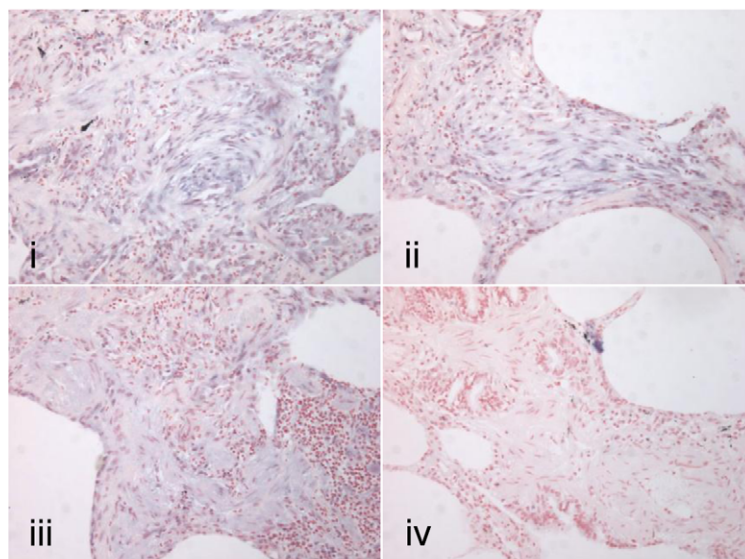


Figure 6. miR-199a-5p and its target CAV1 are dysregulated in IPF. (A,B) Box plots showing the normalized expression of log₂-transformed CAV1 and miR-199a-5p in both IPF (n=94) and control (n=83) lungs. The box represents the 25–75% quartiles, the line in the box represents the median and whiskers represent the range. (**p<0.001). (C) Immunohistochemical analysis of CAV1 expression in lung tissue sections from IPF patients (i, ii and iii) and normal lung (iv). Three representative sections are shown (IPF n=8 and control n=8). (D) *In situ* hybridization (ISH) was performed to determine the localization of miR-199a-5p in lung tissue of IPF patients (i, ii and iii). ISH with scrambled probes (iv). Three representative sections are shown (n=6).
doi:10.1371/journal.pgen.1003291.g006

using the same miRNA based platform. We identified 5 miRNAs commonly dysregulated at a p-value of less than 0.01 (Figure 9A). Among these miRNAs, 3 were downregulated (miR-193, miR-30b and miR-29c) and 2 were upregulated (miR-199a-3p and miR-199a-5p) (Figure 9B).

The enhanced expression of miR-199a-5p was confirmed in two independent experimental models of liver fibrosis (Figure 10A–10C) and was correlated with the severity of liver fibrosis, as BALB/C mice have a more pronounced liver fibrosis than C57BL/6 mice, following administration of CCL₄ (Figure 10A and 10B). In addition, miR-199a-5p was significantly decreased during regression of experimental CCL₄-induced liver fibrosis (Figure 10D). Furthermore, we showed that TGFβ exposure of stellate cells was associated with an increase of miR-199a-5p expression and a decrease of CAV1 expression level (Figure 10E and 10F). Interestingly, enhanced expression of miR-199a-5p was also observed in clinical samples from patients with liver fibrosis (Figure S13).

Similarly, data obtained from the unilateral ureteral obstruction model of kidney fibrosis showed an enhanced expression of miR-199a-5p in the injured kidney compared to sham operated mice (Figure 11A). Interestingly, as for lung fibrosis, kidney expression of miR-199a-5p was correlated with disease progression. As depicted in Figure 11B, *in situ* hybridization performed 28 days after surgery (*i.e.* when the fibrosis is established) showed no detectable signal for miR-199a-5p in normal kidney, whereas the hybridization signal was greatly enhanced throughout the injured kidney in area consistent with (myo)fibroblasts. Furthermore, immunohistochemistry of CAV1 performed on fibrotic kidney from mice 28 days after surgery showed a marked reduction of CAV1 in fibrotic area of the kidney (Figure 11C).

Discussion

MiRNA expression profiling using high-throughput genomic approaches has provided important new insights into the pathogenesis, classification, diagnosis, stratification, and prognosis of many human diseases including tissue fibrosis [15,35,36]. In particular, such approaches have been previously successfully applied to IPF, revealing miR-21 and let-7d as important contributors to the lung fibrosis process [13,14]. Our work represents however, to our knowledge, the first analysis of miRNAs involved into the differential susceptibility of two murine strains to bleomycin-induced lung fibrosis. The identification of a specific miRNA profile associated with bleomycin-sensitive animals suggests the functional importance of these dysregulated miRNAs during the pathogenic processes leading to lung fibrosis. MiR-199a-5p appeared as the most statistically significant and was well correlated to IPF progression. Thus, altered expression of miR-199a-5p is likely to represent a primary pathogenic mechanism in the development of lung fibrosis rather than a secondary effect of the long-standing disease process. Other miRNAs candidates including miR-214, clustered with miR-199a-2 on mouse chromosome 1 as well as other miRNAs that have been previously associated to fibrosis, including miR-221-222 and miR-449a [37,38] also showed an enhanced expression in the lung fibrosis-susceptible mice. These miRNAs need to be further

analyzed in IPF samples, as previous studies have shown their implication in the regulation of the stress response or the cell cycle/apoptosis balance in the epithelial or fibroblast compartment [38–41].

MiR-199a is an evolutionary conserved small RNA initially identified in the context of inner ear hair cells development and chondrogenesis [42–44] and numerous reports have now shown its implication in various tumor types [45–47]. In the context of tissue fibrosis, both mature forms of miR-199a (*i.e.*, miR-199a-5p and miR-199a-3p) have been associated with the progression of liver fibrosis in both humans and mice [48,49]. While our data also showed an enhanced pulmonary expression of these two miRNAs in the bleomycin-induced mouse model, expression of miR-199a-5p was more significant in IPF samples (Table S3 and Figure S14A). Moreover, our data indicated that miR-199a-3p had distinct effects on lung fibroblasts differentiation than miR-199-5p, as assessed by their different impact on αSMA (Figure S14B and data not shown). This led us to investigate in depth miR-199a-5p profibrotic effects.

In a recent report describing the miRNA expression profile of lung fibroblasts, miR-199a-5p was found to be highly expressed [25]. Our present data establish stromal cells as the primary source of miR-199a-5p in the injured lungs and also suggests that miR-199a-5p is involved in the profibrotic effects mediated by pulmonary fibroblasts. A combination of *in silico* and experimental data, described in [25,26,40], identified the transcripts affected by miR-199a-5p in lung fibroblasts. Functional annotations of the miR-199a-5p experiments highlighted terms such as “Integrin Signaling” and “Caveolar-mediated Endocytosis Signaling”. Among the set of transcripts that were down-regulated after ectopic expression of miR-199a-5p, we then restricted our work to a group of 21 miR-199a-5p target genes predicted by 3 independent algorithms, showing the largest modulation factors and smallest statistical p-values. This short list included *CAV1*, a structural component of caveolae, previously associated with lung fibrosis [14,18,19].

Caveolae refer to 50–100 nanometers small bulb-shaped invaginations of the plasma membrane. They exert major biological functions in numerous cellular processes such as membrane trafficking or cell signaling [50]. CAV1 and CAV2, the main coat proteins of caveolae, are relatively highly expressed in endothelial cells and fibroblasts of pulmonary origin [51]. Caveolae role is particularly important in the context of TGFβ signaling. Whereas TGFβ receptor endocytosis via clathrin-coated pit-dependent internalization promotes TGFβ signaling, the lipid raft-caveolar internalization pathway facilitates the degradation of TGFβ receptors, therefore decreasing TGFβ signaling [52]. Previous studies have shown that a reduced CAV1 expression in lung fibroblasts contributes to IPF pathogenesis by promoting TGFβ profibrotic effects [19]. In line with this, we provide evidence that miR-199a-5p can directly repress CAV1 in lung fibroblasts, thereby stimulating their proliferation, migration, invasion and differentiation into myofibroblasts (Figure 12). Additionally, we showed in a large cohort of IPF patients an enhanced expression of miR-199a-5p that was reproduced in three independent mouse models of fibrosis as well as a decreased

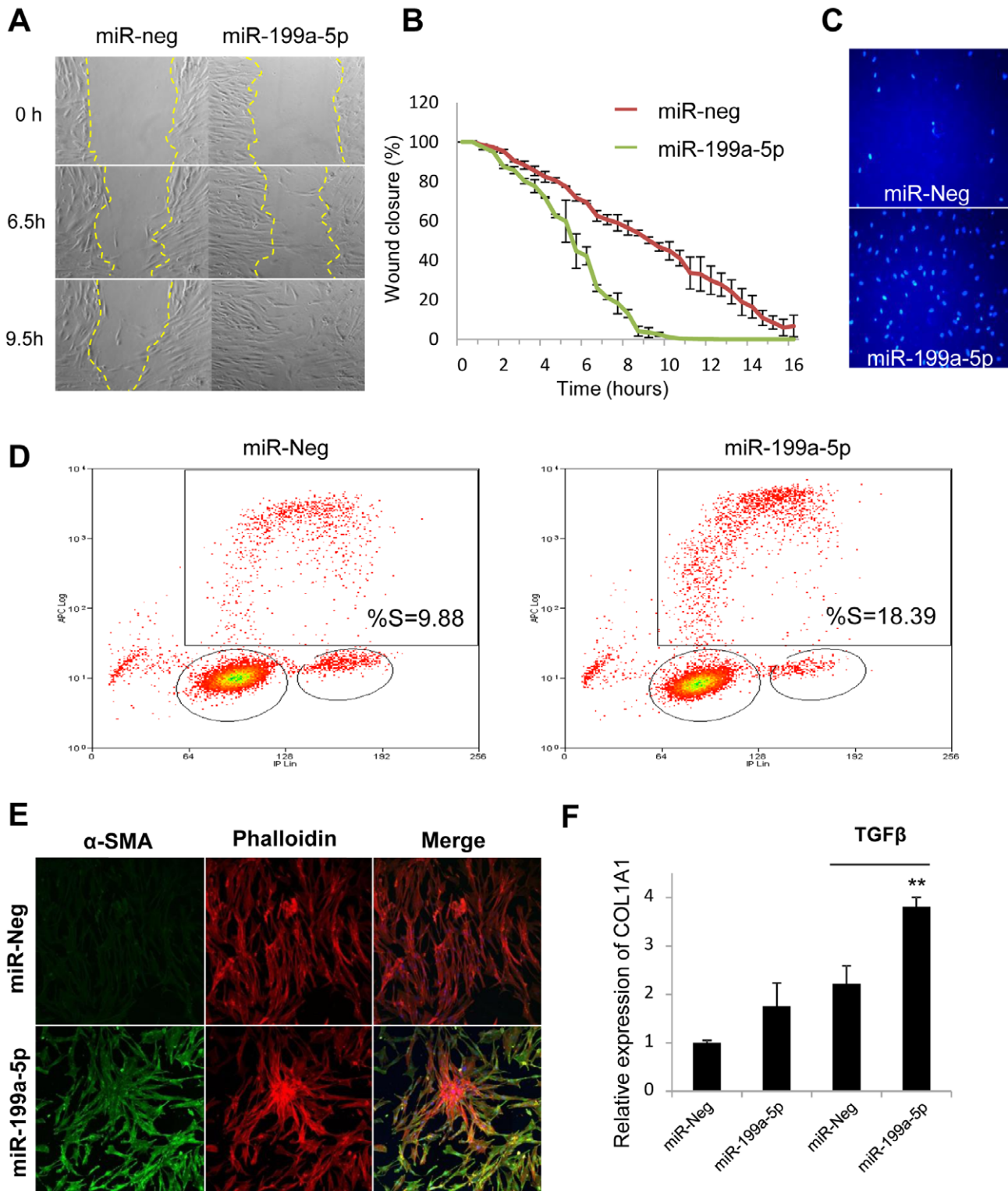


Figure 7. Functional impact of miR-199a-5p on lung fibroblasts. Increased expression of miR-199a-5p in lung fibroblasts results in an enhanced ability of fibroblasts to migrate, invade matrigel, proliferate and differentiate into myofibroblasts. Lung fibroblasts were transfected with 10 nM of miR-199a-5p mimic or control. (A,B) *In vitro* scratch assay was performed to assess the rate of migration of A significant increase ($p < 0.01$) in the migration rate was observed in miR-199a-5p transfected hFL1 lung fibroblasts compared with control. Data are representative of two independent experiments. (C) Invasion assay on matrigel showing that overexpression of miR-199a-5p increases MRC5 lung fibroblast invasiveness. Data are representative of two independent experiments. (D) Proliferation assay was performed by bivariate flow cytometric analysis of EdU/DNA-stained MRC5 cells. The x-axis represents the linear intensity obtained from propidium iodide (total DNA content), and the y-axis represents the logarithmic intensity obtained from the Alexa Fluor 647. Cells are separated into G0/G1 phase and G2/M phase according to their DNA content, and into labeled undivided and labeled divided subgroups according to the DNA content of EdU-labeled cells. The % of cells in S phase is indicated on the

upper right panel. One representative experiment out of three is shown. (E) Confocal microscopy of MRC5 cells overexpressing miR-199a-5p revealed that increasing miR-199a-5p levels in lung fibroblasts promotes their differentiation into myofibroblasts. Cells were stained with an antibody against α -SMA (green) and phalloidin (red). Experiments were performed twice. (F) Relative expression of COL1A1 was assessed by Taqman PCR in MRC5 cells overexpressing miR-199a-5p and exposed or not to TGF β . Data are expressed as mean \pm SEM and derived from 2 independent experiments. * $p < 0.05$.

doi:10.1371/journal.pgen.1003291.g007

expression of CAV1. Finally, in contrast to a recent report showing that miR-199a-5p, by targeting SMAD4, inhibited TGF β -induced gastric cancer cell growth [53], we found that lung fibroblasts overexpressing miR-199a-5p have an increased SMAD4 expression (Figure S14B), suggesting thus a potential opposite function of this miRNA between epithelial and mesenchymal cells.

MiRNAs, by affecting the expression of multiple genes, can act as master regulators of complex biological processes and aberrant expression of miRNA is known to have a profound impact on various distinct biological pathways. Thus, the elucidation of the critical genes and relevant pathways/networks modulated by miRNAs is important to understand the mechanisms by which miRNAs exert their pathogenic effects. Our systematic analysis of the gene expression profiles of lung fibroblasts overexpressing miR-199a-5p led to the identification of a large number of transcripts that were significantly modulated by this miRNA. These experiments have established that miR-199a-5p is directly or indirectly involved in the regulation of genes previously associated with lung fibrosis: *CCL2*, a potent mononuclear cell chemoattractant, *PLAU* [54], a component of the fibrinolysis system, *TGFBRI*, the TGF β receptor type I [55], *MMP3* [56] and *CAV2* [57]. Interestingly, these regulations were independent of CAV1 targeting, suggesting therefore that miR-199a-5p modulates the expression of several components of various distinct biological pathways to elicit, in lung fibroblasts, a profibrotic response.

Before this study, miR-21 was clearly established as an effector of TGF β signaling, able to promote fibroblast proliferation and differentiation into myofibroblasts [58]. In the context of lung fibrosis, miR-21 has been described to mediate lung fibroblast activation and fibrosis [14]. MiR-199a-5p and miR-21 exert indeed similar pro-fibrotic effects on lung fibroblasts. This is further demonstrated by overexpression of miR-21 and miR-199a-5p, which induce lung fibroblast migration to a similar extent (Figure S15). Interestingly, while both miRNAs appear as TGF β effectors, the comparison of their associated gene expression signature indicated a limited overlap (Figure 2A). Moreover, CAV1 expression is unaffected by overexpression of miR-21 in lung fibroblasts, suggesting that both miRNAs, in response to TGF β , modulate distinct signaling pathways to produce cooperative effects involved in fibroblast activation.

The mechanisms involved in the TGF β -dependent modulation of miR-21 and miR-199a-5p are also of particular interest. While both miR-21 and miR-199a-5p have been shown to be regulated by TGF β , their expression may be primarily regulated through a Smad-dependent post-transcriptional mechanism promoting miRNA maturation by Drosha [59,60]. Our data showing that both pri-miRNA-199a1 and pri-miRNA-199a2 are significantly upregulated in bleomycin-treated mice (Figure S2B) and TGF β -stimulated fibroblasts (Figure S16) suggest that additional TGF β -dependent transcriptional regulations occur that will need to be more fully analyzed.

Finally, our observation that miR-199a-5p is also dysregulated in two additional experimental models of tissue fibrosis (*i.e.* kidney fibrosis and liver fibrosis) establishes miR-199a-5p as a ubiquitous factor associated with tissue fibrogenesis. The recently reported association of CAV1 with kidney fibrosis [61,62], together with the

exclusive distributions of miR-199a-5p and CAV1 in the injured kidney, leads us to hypothesize that miR-199a-5p also controls CAV1 expression in kidney, thus contributing to kidney fibrosis. Further information came from the liver fibrosis model. As liver fibrosis can regress after cessation of the triggering injury, even at advanced fibrotic stages [63], the decrease of miR-199a-5p observed during resolution of liver fibrosis sets for the first time a specific miRNA as an important player for orchestrating the molecular events occurring during regression of liver fibrosis. Importantly, this implies that therapeutic strategies based on modulation of miRNAs have a potential to prevent liver fibrosis progression but also to resolve liver fibrosis.

In conclusion, the results of this study further underline the pivotal roles played by specific miRNAs in mediating changes in gene expression and cell functions occurring during pulmonary fibrosis. In particular, our results identified miR-199a-5p as a new determinant of tissue fibrosis. We thus anticipate that strategies preventing the up-regulation of miR-199a-5p may represent a new effective therapeutic option to treat fibroproliferative diseases.

Methods

Cell lines, reagents, and antibodies

Human normal pulmonary fibroblasts MRC-5 (CCL-171) and hFL1 (CCL-153), human lung cancer cell line A549 (CCL-185) and HEK-293 (CRL-1573) cells were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA), frozen at an early passage and each vial used for experiments was cultured for a limited number of passages (<8). For maintenance, cells were cultured in the appropriate medium (MEM for MRC-5, F12-K for hFL1 and A549, DMEM for HEK-293) containing 10% fetal calf serum (FCS), at 37°C with 5% v/v CO₂. Recombinant TGF β was purchased from Sigma-Aldrich. The following monoclonal (mAbs) and polyclonal (pAbs) Antibodies were used: rabbit anti-CAV1 pAbs (sc-894, Santa Cruz Biotechnology Inc.), rabbit anti-SMAD4 (9515) and anti- β -Actin (13E5) mAbs (Cell Signalling), mouse anti- α SMA mAbs (1A4, Dako) for immunohistochemistry and (4A8-2H3, Abnova) for Western Blot and immunocytofluorescence.

Animal treatment

All animal care and experimental protocols were conducted according to European, national and institutional regulations. Personnel from the laboratory carried out all experimental protocols under strict guidelines to insure careful and consistent handling of the mice.

Mouse model of lung fibrosis. 9–12 weeks old male C57BL/6 and BALB/C mice were purchased from Charles River, France. To induce fibrotic changes, mice were intratracheally instilled with bleomycin or PBS as previously described [25,64]. Briefly, mice were anesthetized with sevoflurane inhalation (Abbott) and placed in dorsal recumbency. Transtracheal insertion of a 24-G animal feeding needle was used to instillate bleomycin (0.75 unit/ml) or vehicle (PBS), in a volume of 80 μ l. Mice were sacrificed 7 and 14 days after instillation and lungs were removed for further analysis. Expression analyses were performed on 5 mice per group except for the miRNA microarray

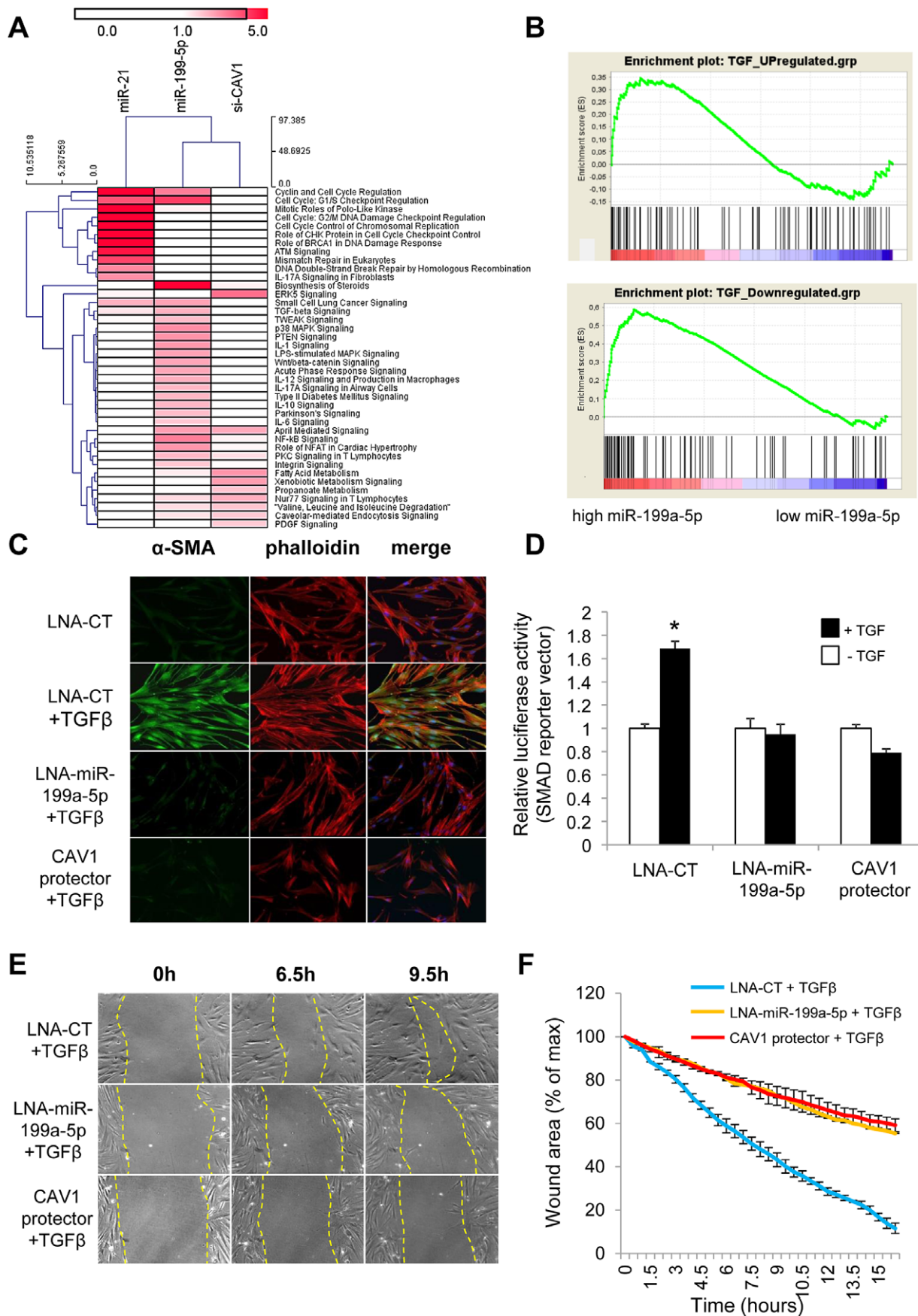


Figure 8. miR-199a-5p is an effector of the TGF β pathway. (A) Heatmap of significant canonical pathways associated with miR-199a-5p, miR-21 and siCAV1 conditions identified through Ingenuity Pathway Analysis. (B) Gene Set enrichment analysis plots for an experimental TGF β -signature showing significant enrichment for miR-199a-5p up- and down-regulated genes. Data were treated according to Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) software, with transcripts being ordered according to miR-199a-5p versus miR-Neg conditions scaled by their standard deviation. Up- and Down-regulated genes were run separately against an experimental TGF β signature obtained in the same cellular models (hFL1 fibroblasts treated with 10 ng/ml TGF β during 48 h): 2 sets of 134 and 113 genes corresponding to TGF β up- and down-regulated gene sets have been selected as described in the Materials and Method section ($p < 0.05$). In each case, graphs show the enrichment plot, the score at the peak corresponding to the ES and the position of the TGF β gene set in the ranked list of genes (each transcript indicated by a vertical bar). (C) MRC5 cells were transfected with LNA-miR-199a-5p, CAV1 protector or LNA-control, then incubated with or without 10 ng/ml TGF β for 24 h and cells were stained with an antibody against α -SMA (green), phalloidin (red) and DAPI (blue). Experiments were performed twice. (D) Cells were co-transfected with SMAD-luciferase reporter plasmid, luciferase activities were analyzed 48 h after transfection. All firefly luciferase activities were normalized with renilla luciferase activity. * $p < 0.05$. Two independent experiments. (E) and (F) *In vitro* scratch assay was performed to assess the migration rate of TGF β -stimulated hFL1 lung fibroblasts treated with LNA-anti-miR-199a-5p, LNA-control inhibitor and CAV1 protector. A significant decrease ($p < 0.01$) in the migration rate was observed in both LNA-anti-miR-199a-5p and CAV1 protector transfected lung fibroblasts compared with control. Data are representative of two independent experiments.
doi:10.1371/journal.pgen.1003291.g008

experiment where 3 mice per group were used. Histological analyses and western blot were performed on 3 C57BL/6 mice.

Mouse model of kidney fibrosis. 9–12 weeks old male C57BL/6 mice were purchased from Charles River, France. Mice underwent anesthesia by intraperitoneal injection of pentobarbital (50 mg/kg body wt). After a standard laparotomy, the left proximal ureter was exposed and ligatured with 4-0 silk at two points. The sham operation consisted of a similar identification of the left ureter, but ligation of the ureter was not performed. Expression analyses were performed on 4 to 7 mice per group. For the histological analyses, 2 to 3 mice were used.

Mouse model of liver fibrosis. 6–8 weeks old male C57BL/6 and BALB/C mice were purchased from Jackson laboratory (Bar Harbor). To induce liver fibrosis, mice received 0.6 ml/kg body weight of CCl₄ (Merck) mixed with corn oil (Sigma life science) intraperitoneally as previously described [65]. Bile duct ligation (BDL) was performed by exposing the common biliary duct and double-ligaturing it, then cutting through between the ligations as described in [65]. For fibrosis regression mice were treated for 6 weeks with CCl₄ as described above and sacrificed 2 or 4 weeks respectively after the end of treatment. For CCl₄ induced liver fibrosis mouse model, expression analyses were performed on 5 mice whereas 4 mice were used for bile duct ligation.

Isolation of primary stellate cells

Primary stellate cells were isolated from C57BL/6 mice at the age of 40 to 55 weeks and stimulated with 20 ng/ml of TGF- β (Sigma Aldrich) for 48 h as previously described [65].

Human lung tissue

Flash frozen lung tissue from 94 human subjects with IPF and 83 control subjects with no chronic lung disease were obtained from the Lung Tissue Research Consortium (LTRC). These diagnoses were made using ATS/ERS guidelines [66,67] from review of clinical history, pathology, and radiology. All experiments were approved by the local Institutional Review Board at the University of Pittsburgh (IRB# 0411036). Clinical data were made entirely available to the investigators for review.

Paraffin lung sections from patients with IPF were obtained from Lille's Hospital. Experiments were approved by the institutional review board of Lille's Hospital.

Histopathology

Kidneys and lungs were fixed overnight with neutral buffered formalin and then embedded in paraffin. Five-micrometer-thick sections were mounted and stained with hematoxylin and eosin as well as Masson's trichrome to assess the degree of fibrosis. Histologic sections were reviewed by an experienced pathologist.

RNA isolation

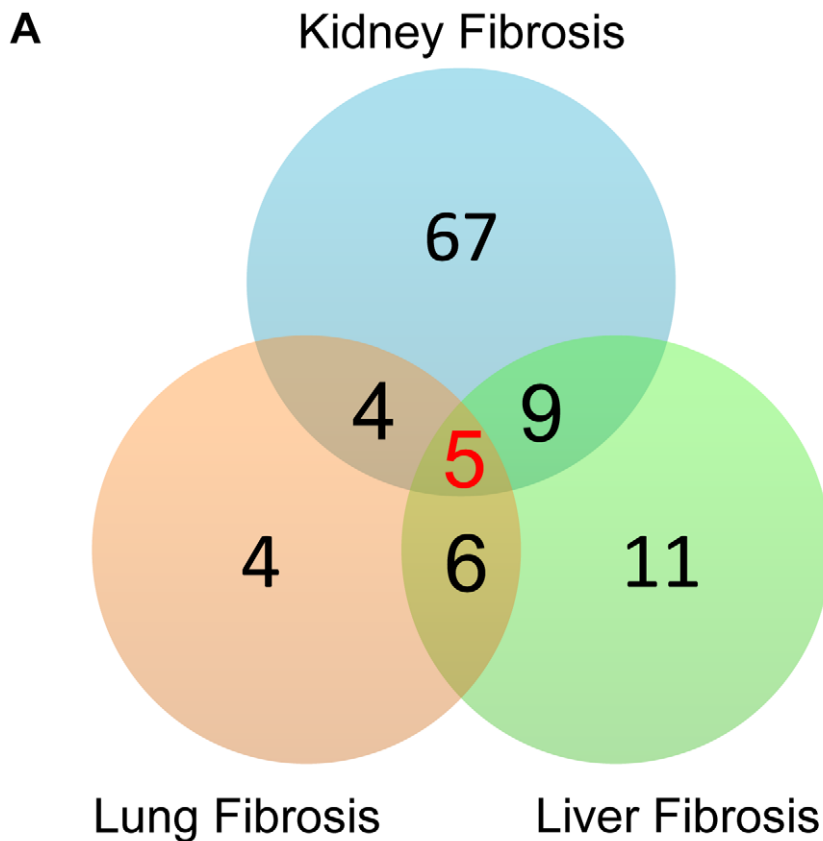
Total RNA were extracted from lung tissue and cell samples with TRIzol solution (Invitrogen). Integrity of RNA was assessed by using an Agilent BioAnalyser 2100 (Agilent Technologies) (RIN above 7).

Microarrays

MiRNA microarrays of mice lungs. The oligonucleotide sequences corresponding to 2054 mature miRNAs found in the miRNA registry (Release 8.2 [68]) are available on <http://www.microarray.fr:8080/merge/index> (follow the link to "microRNA": platform referenced in GEO as GPL4718). Three biological replicates were performed for each comparison. The experimental data and microarray design have been deposited in the NCBI Gene Expression Omnibus (GEO) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) under serie GSE34812. The experimental design used a dye-swap approach, so that each mouse probe, printed 8 times on the microarray was measured independently 16 times for each sample. Target preparation and array hybridization were performed as previously described [24–26].

MiRNA microarray analysis of human lungs. A microRNA microarray analysis was done as previously described by us [13]. Briefly, 100 ng of total RNA was labeled and hybridized onto the Agilent microRNA Microarray Release 16.0, 8×60K. After washing, the arrays were scanned using the Agilent Microarray Scanner. The scanned images were processed by Agilent's Feature Extraction software version 9.5.3. MicroRNA microarray data analysis was done using GeneSpring v11.5 and BRB-ArrayTools v4.1 developed by Dr. Richard Simon and the BRB-ArrayTools Development Team. The data were quantile normalized. MicroRNA microarray data are publically available through the Lung Genomics Research Consortium (LGRC) website (lung-genomics.org).

Expression microarrays. For gene expression arrays RNA samples were labeled with Cy3 dye using the low RNA input QuickAmp kit (Agilent) as recommended by the supplier. 825 ng of labeled cRNA probe were hybridized on 8×60K high density SurePrint G3 gene expression mouse or human Agilent microarrays. Two (human *in vitro* experiments) or five (*in vivo*-derived samples) biological replicates were performed for each comparison. The experimental data have been deposited in the NCBI Gene Expression Omnibus (GEO) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) under SuperSerie record GSE34818 (series GSE34812 and GSE34814 for miRNA and mRNAs responses to bleomycin instillation, respectively; serie GSE34815 for miRNA/siRNA transfection experiments in human fibroblasts hFL1). For the human gene expression arrays, the data was log₂ transformed and normalized using a cyclic loess algorithm in the R programming environment as previously described [69]. The human microarray



B

miRNA	miRNA sequence	Expression change
mmu-miR-193	AACUGGCCUACAAAGUCCCAGU	downregulated
mmu-miR-29c	UAGCACCAUUUGAAAUCGGUUA	downregulated
mmu-miR-30b	UGUAAACAUCUACACUCAGCU	downregulated
mmu-miR-199a-3p	ACAGUAGUCUGCACAUUGGUUA	upregulated
mmu-miR-199a-5p	CCCAGUGUUCAGACUACCUGUUC	upregulated

Figure 9. MiR-199a-5p is commonly dysregulated in three experimental mouse models of liver, lung, and kidney fibrosis. (A) Venn diagram showing the relationships of miRNA expression changes in lungs from C57BL/6 14 days after Bleomycin treatment (n=4 mice), livers from BALB/C mice 6 weeks after CCl₄ administration (n=5 mice) and kidneys from C57BL/6 mice 28 days following unilateral ureteral obstruction (n=4 mice). The numbers of miRNAs whose expression was differentially detected in each mouse model at p<0.01 are shown. Data on liver fibrosis are from (17). (B) List of the 5 miRNAs dysregulated in the three experimental models of fibrosis. ttest, p<0.01.
doi:10.1371/journal.pgen.1003291.g009

data has been made available at the LTRC (ltrcpublic.org) and the LGRC websites as part of the LTRC protocol.

Statistical analysis and biological theme analysis. Normalization was performed using the Limma package available from Bioconductor (<http://www.bioconductor.org>). Intra slide (for 2 colours dye-swap experiments only) and inter slide normalization was performed using the Print Tip Loess and the quantile methods, respectively. Means of ratios from all comparisons were calculated and B test analysis was performed. Differentially expressed genes were selected using Benjamini-Hochberg correction of the p-value for

multiple tests, based on a p-value below 0.05. Data from expression microarrays were analyzed for enrichment in biological themes (Gene Ontology molecular function and canonical pathways) and build biological networks built using Ingenuity Pathway Analysis software (<http://www.ingenuity.com/>) and Mediant (http://www.microarray.fr:8080/merge/index) [70], an information system containing diverse information about probes and data sets. Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) was used to determine whether an *a-priori* defined set of genes can characterize differences between two biological states [34,71]. Hierarchical clusterings were done with the MultiExperiment Viewer

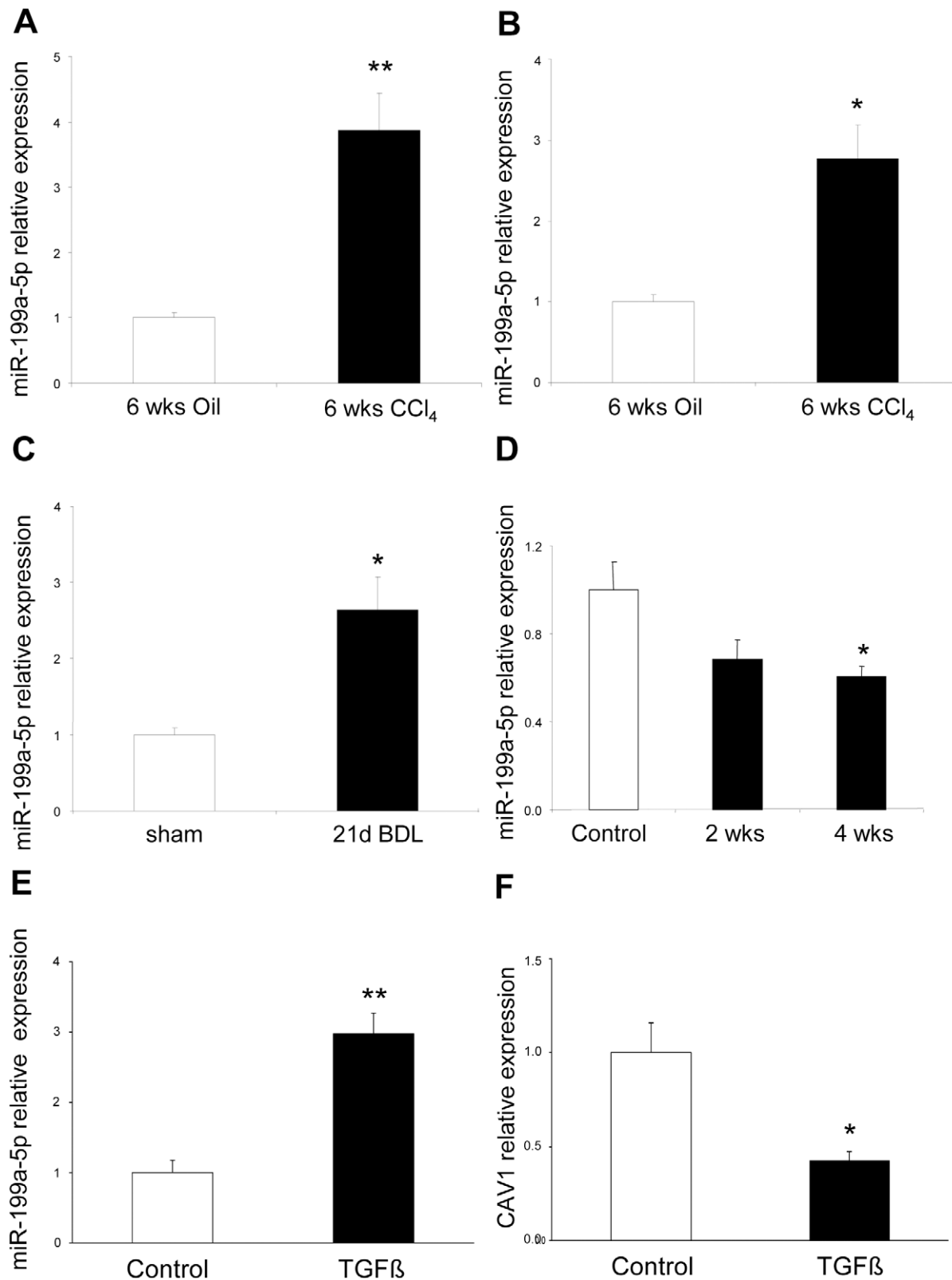


Figure 10. Altered expression of miR-199a-5p in CCl₄ induced liver fibrosis mouse model. (A) Expression of miR-199a-5p in livers from 6 weeks CCl₄-treated or oil-treated BALB/C mice was analyzed by qPCR; n=5 per group. Data are expressed as mean ± SEM. ** p<0.01. (B) Expression of miR-199a-5p in livers from 6 weeks CCl₄-treated or oil-treated C57BL/6 mice was analyzed by qPCR; n=5 mice per group. Data are expressed as mean ± SEM. * p<0.05. (C) Expression of miR-199a-5p in livers from C57BL/6 mice 21 days following bile duct ligation or sham operation was analyzed by qPCR; n=4 mice per group. Data are expressed as mean ± SEM. * p<0.05. (D) Expression of miR-199a-5p in liver of C57BL/6 mice during fibrosis regression. Liver fibrosis was induced by injection of CCl₄ and expression of miR-199a-5p was assessed 6 weeks after CCl₄ treatment as well as

2 and 4 weeks after the last injection. Data are expressed as mean \pm SEM. * $p < 0.05$; Expression of miR-199a-5p (E) and CAV1 (F) in primary stellate cells isolated from C57BL/6 mice and stimulated with 20 ng/ml TGF β for 48 h.
doi:10.1371/journal.pgen.1003291.g010

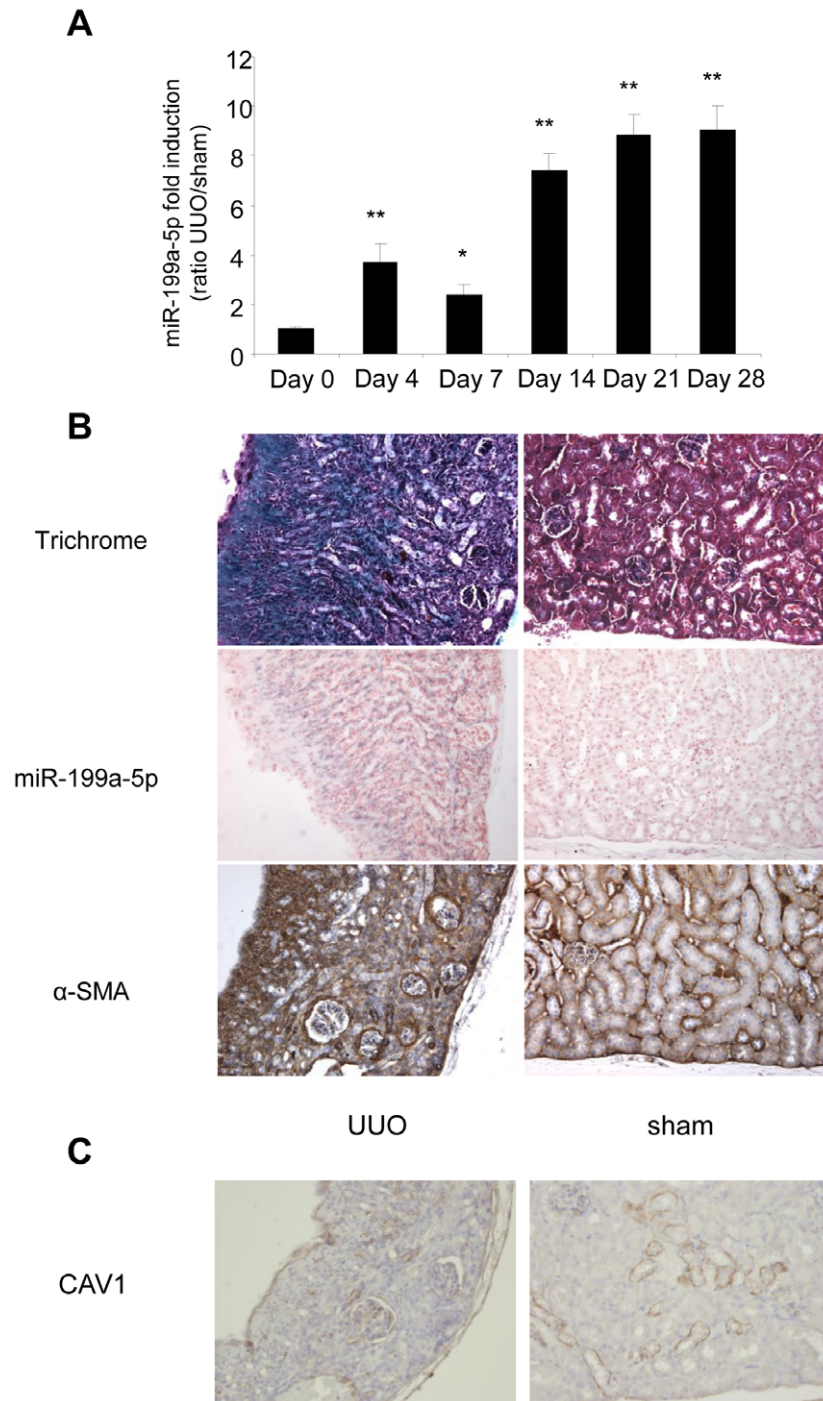


Figure 11. Altered expression of miR-199a-5p and CAV1 in the unilateral ureteral obstruction (UUO) mouse model of kidney fibrosis. (A) miR-199a-5p expression in kidney from C57BL/6 mice after UUO at the indicated time points. $n = 5$ to 7 mice in each group. Data are expressed as mean \pm SEM. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$. (B) Paraffin sections were prepared from kidneys of C57BL/6 mice harvested 28 days after UUO. *In situ* hybridization assay was performed to determine the localization of miR-199a-5p in the kidney. Results represent one out of three independent experiments. (C) Immunohistochemical analysis of CAV1 expression in kidney tissue sections from C57BL/6 mice 28 days after UUO. One representative section out of two is shown.
doi:10.1371/journal.pgen.1003291.g011

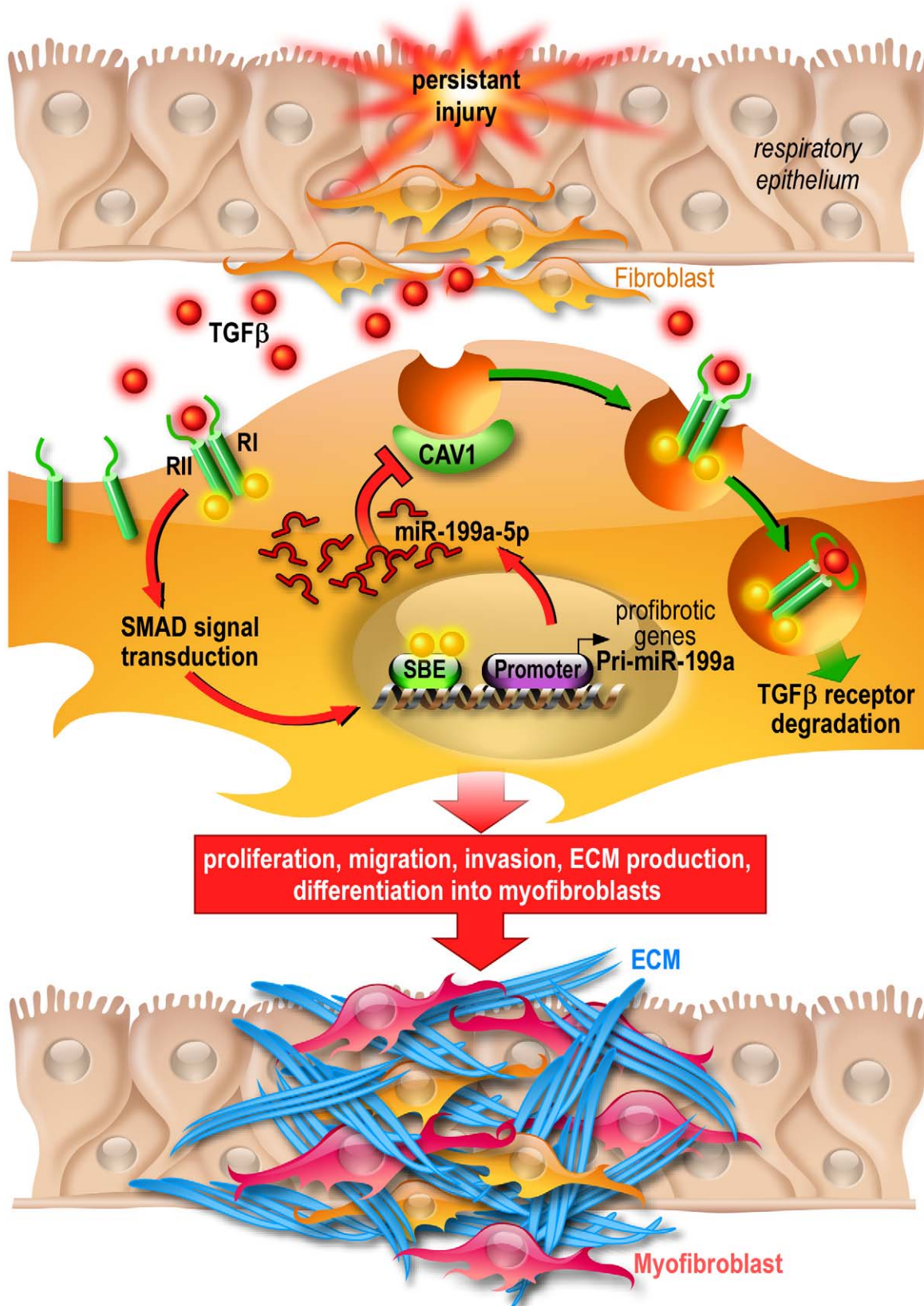


Figure 12. Proposed model of miR-199a-5p profibrotic function in lung fibrogenesis. Persistent injury of the respiratory epithelium causes release of profibrotic factors such as TGFβ. In lung fibroblasts, TGFβ binds to TGFβR I (RI) and II (RII) and the resultant complex can be internalized via two distinct endocytic pathways. The clathrin-coated pit pathway (red arrows) increases TGFβ signal transduction leading to the activation of lung

fibroblasts and ultimately lung fibrosis whereas the CAV1 lipid raft pathway (green arrows) mediates TGF β /TGF β R complex degradation, thus decreasing TGF β signaling and preventing lung fibrosis [73]. Production of miR-199a-5p in response to TGF β in lung fibroblasts results in CAV1 downregulation and subsequently, impaired TGF β /TGF β R complex degradation. This miRNA-mediated mechanism for low CAV1 expression promotes TGF β signaling and the pathogenic activation of lung fibroblasts. CAV1 = caveolin-1, TGF β = Transforming Growth factor- β , TGF β R = Transforming Growth factor- β Receptor, SBE = SMAD Binding Element, ECM = Extracellular Matrix.
doi:10.1371/journal.pgen.1003291.g012

(MeV) program version 4.3, using a Manhattan distance metric and average linkage.

MiRNA targets analysis. MiRonTop [29] is an online java web tool (available at <http://www.microarray.fr:8080/miRonTop/index>) that integrates DNA microarrays data to identify the potential implication of miRNAs on a specific biological system. Briefly, MiRonTop ranks the transcripts into 2 categories ('Upregulated' and 'Downregulated'), according to thresholds for expression level and for differential expression. It then calculates the number of predicted targets for each miRNA, according to the prediction software selected (Targetscan, MiRBase, PicTar, exact seed search: 2–7 or 1–8 first nucleotides of the miRNA, TarBase v1), in each set of genes. Enrichment in miRNA targets in each category is then tested using the hypergeometric function. The absence of siRNA off-target effect was checked in si-CAV1 transcriptome experiments using the Sylamer Tool [72].

Transfection and luciferase assays

Pre-miRNAs, LNA-based miRNA inhibitors, target site blocker, and siRNAs transfection in lung fibroblasts. Pre-miR-199a-5p, pre-miR-21 and control miRNA (miR-Neg # 1) were purchased from Ambion. For miR-199a-5p knockdown and target site blocker experiments, anti-miR-199a-5p LNA, negative control anti-miR-159s LNA (miRCURY LNA Knockdown probes) and CAV1 protector were ordered from Exiqon. siRNA directed against CAV1 and control siRNA (Silencer Select validated siRNAs) were from Applied Biosystems. MRC5/hFL1 cells were grown in 10% FCS in DMEM and transfected at 30 to 40% confluency in 6- 12- or 96 well plates using Lipofectamin RNAi MAXTM (Invitrogen) with pre-miRNA, siRNAs LNA inhibitors and CAV1 protector at a final concentration of 10 nM unless indicated.

Pre-miRNAs and psiCHECK-2 plasmid constructs co-transfection. Molecular constructs were made in psiCHECK-2 (Promega) by cloning behind the Renilla luciferase in the XhoI and NotI restrictions sites, annealed oligonucleotides derived from the CAV1 3' UTR described below. Mutated nucleotides located in the miR-199a-5p-binding site are underlined. HEK293 cells were plated into 96-well and cotransfected using lipofectamin 2000 (Invitrogen) with 0.2 μ g of psiCHECK-2 plasmid construct and pre-miR-199a-5p or control miRNA at different concentrations. 48 hours after transfection, Firefly and Renilla Luciferase activities were measured using the Dual-Glo Luciferase assay (Promega).

hsa-CAV1: WT (sense):

TCGAGGACACTTTAATTACCAACCTGTTACCTACTT-TGACTTTTTGCATTTAAACAGACACTGGCATGGATA-TAGTTTTACTTTTAAACTGTGTACGC

hsa-CAV1: WT (reverse):

GGCCGCGTACACAGTTTAAAAAGTAAAACTATATCCA-TGCCAGTGCTGTTTTAAATGCAAAAAGTCAAAGTAG-GTAACAGGTTGGTAATTAAAGTGTCC

hsa-CAV1: MUT (sense):

TCGAGGACACTTTAATTACCAACCTGTTACCTACTT-TGACTTTTTGCATTTAAACAGAGAGTCGCATGGATA-TAGTTTTACTTTTAAACTGTGTACGC

hsa-CAV1: MUT (reverse):

GGCCGCGTACACAGTTTAAAAAGTAAAACTATATCCA-TGCCAGTCTCTGTTTTAAATGCAAAAAGTCAAAGTAG-GTAACAGGTTGGTAATTAAAGTGTCC

Smad reporter assay. MRC5 cells were seeded in 96 well plate and cotransfected 24 h later at 40% confluency using RNAi MAX lipofectamine reagent with 100 ng SMAD reporter vector (Signal Smad reporter, - QIAGEN) and 10 nM LNA-control, LNA-199a-5p or CAV1 protector. Twenty four hours after transfection, cells were serum starved 3 h before adding 10 ng/ml TGF β . Cells were lysed and Glo luciferase assay (Promega) was performed 24 h following TGF β exposure.

Quantitative RT-PCR

Mature miRNA expression. MiR-199a-5p expression was evaluated using TaqMan MicroRNA Assay (Applied Biosystems) as specified in their protocol. Real-time PCR was performed using Universal Master Mix (Applied Biosystems) and ABI 7900HT real-time PCR machine. Expression levels of mature microRNAs were evaluated using comparative CT method ($2^{-\Delta\Delta CT}$).

Pri-miRNA expression. Pri-miR-199a-1 and pri-miR-199a-2 expression were evaluated using TaqMan pri-microRNA Assay (Applied Biosystems) following manufacturer's recommendations. Real-time PCR was performed using TaqMan gene expression Master Mix (Applied Biosystems) and ABI 7900HT real-time PCR machine. Expression levels of pri-miRNAs were evaluated using comparative CT method ($2^{-\Delta\Delta CT}$).

Gene expression. Expression levels of both human and mouse CAV1, human COL1A1 were analyzed using TaqMan MicroRNA Assay (Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions. Real-time PCR was performed using TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems) and ABI 7900HT real-time PCR machine. Expression levels were evaluated using comparative CT method ($2^{-\Delta\Delta CT}$). For normalization, transcript levels of RNU44 (human samples) and sno202 (mouse samples) were used as endogenous control for miRNA real time PCR. Transcript levels of PPIA (human and mouse samples) were used as endogenous control for gene/pri-miRNA expression.

Protein extraction and immunoblotting

Cells or tissues were lysed in lysis buffer (M-PER protein extraction reagent for cells, T-PER protein extraction reagent for tissues) and protease inhibitors cocktail (Pierce). The lysates were quantified for protein concentrations using the Bradford assay (Biorad). Proteins (10 μ g per sample) were separated by SDS-polyacrylamide gel and transferred onto nitrocellulose membranes (GE Healthcare). The membranes were blocked with 5% fat free milk in Tris-buffered saline (TBS) containing 0.1% Tween-20 (TBS-T) and subsequently incubated with CAV1, α -SMA or β -actin primary antibodies overnight at 4°C. After washing with TBS-T for 30 minutes at room temperature, the membrane was further incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies for 1.5 hours, followed by 30 minutes of washing with TBS-T. Protein bands were visualized with Amersham ECL substrates (GE Healthcare).

Immunohistochemistry

Five- μ m paraffin-embedded sections were sequentially incubated in xylene (5 minutes twice), 100% ethyl alcohol (5 minutes twice), 95% ethyl alcohol (5 minutes twice), and 80% ethyl alcohol (5 minutes). After washing with water, the sections were antigen-retrieved using citrate buffer (pH 6.0; DAKO) in a steamer for 20 minutes and cooled to ambient temperature. Sections were then washed with TBS-T and quenched with 3% hydrogen peroxide in TBS for 10 minutes, blocked for avidin/biotin activity, blocked with serum-free blocking reagent, and incubated with primary antibody as follows: for CAV1 staining, sections were incubated with antibody for 1 hour at ambient temperature; for α -SMA staining, sections were incubated with antibody overnight at 4°C. Immunohistochemical staining was developed using the DAB substrate system (DAKO).

In situ hybridization

In situ hybridization of miR-199a-5p was performed using double DIG-labeled LNA probes (Exiqon, Woburn, MA). Paraffin-embedded mouse tissues were dewaxed in xylene and rehydrated in descending grades of alcohol. The slides were then washed in PBS (pH 7.5) and permeabilized by incubating for 15 min in proteinase K (Ambion) for 15 min at 37°C. The slides were again washed in PBS, and prehybridized in hybridization buffer (50% formamide, 5 \times SSC, 0.1% Tween-20, 9.2 mM citric acid, 50 μ g/ml heparin, and 500 μ g/ml yeast RNA, pH 6) in a humidified chamber. The double DIG-labeled LNA probes were then added to the sections at a 80 nM concentration and incubated 2 hours at 50°C in a humidified chamber. The slides were rinsed in 5 \times SSC, 1 \times SSC and 0.2 \times SSC solutions at the same hybridization temperature. This step was followed by blocking with 2% sheep serum, 2 mg/ml BSA in PBS+0.1% Tween-20 (PBST) and incubation with anti-DIG-AP Fab fragments antibody (1:800) (Roche Applied Sciences) for 2 hours at room temperature. After washing in PBST, the color reaction was carried out by incubation in 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP)/nitro blue tetrazolium (NBT) color solution (Roche Applied Sciences) with 1 mM levamisole overnight at room temperature. The color reaction was stopped after observation of sufficient development of blue precipitate by washing with PBST. The slides were then counterstained with Fastred (Sigma Aldrich), mounted and coverslipped.

Immunofluorescence analysis

MRC5 cells were grown on a Round Glass Coverslips Ø 16 mm (thermo scientific) placed inside a 12 Multiwell Plate. Coverslips slides were washed in phosphate-buffered saline and fixed in 4% paraformaldehyde for 15 min, cells were then permeated using 0.1% Triton X-102 (Agilent Technologies) for 10 min. and blocked with PBS solution containing BSA (3%) for 30 min. Incubation with primary antibodies was performed in a blocking solution BSA (1%) at 37°C for 1 h at the following dilutions; α -SMA (1:1000), CAV1 (1:50). After three washes with PBS, cells were incubated with secondary Alexa Fluor 488 goat anti-Mouse IgG (Invitrogen) (1:500), Alexa Fluor 647 goat anti-rabbit IgG (Invitrogen) (1:500) and Alexa Fluor 647 Phalloidin (A22287 - Life technologies) (1Unit/slide). Fourty five min later, Coverslips slides were fixed on microscope slides using ProLong Gold Antifade Reagent with DAPI (Invitrogen). Fluorescence was viewed with an FV10i Olympus confocal scanning microscope.

Cell proliferation assay

MRC5 cells (150,000/well) were seeded in duplicate in DMEM supplemented with 10% FBS on 60-mm cell culture dishes. Cells

were serum starved the next day and transfected with pre-miR-199a-5p at 10 nM. Cell proliferation was assessed 48 h after transfection by flow cytometry using the click-iT EdU cell proliferation assay (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions.

In vitro wound healing assay

hFL1 cells were seeded on Type-I collagen coated 12-well plates and transfected as described above. Forty eight hours after transfection, confluent cells were (FCS) starved 3 h before adding 10 ng/ml TGF β and wounded using a pipet tip. The *in vitro* wound-healing process was then recorded by videomicroscopy for 24 h from then scratching on an Axiovert 200 M inverted microscope (Carl Zeiss) equipped with 37°C and 5% CO₂ regulated insert (Picon GmbH). Brightfield images were taken each 30 min through a 10 \times phase contrast objective with a CoolSNAPHQ CCD Camera managed by Metamorph Software (Roper Scientific). The motility of the cells was assessed by evaluating the repaired area percentage using ImageJ software.

Invasion assay

Invasion of MRC5 fibroblast overexpressing miR-199a-5p was assessed using commercially available 24-well BioCoat Matrigel Invasion Chamber (BD Biosciences). In brief, pulmonary fibroblasts were transfected either with pre-miR-199a-5p or negative control as described above. Twenty four hours after transfection, cells were harvested with trypsin-EDTA, centrifuged, and resuspended in DMEM medium. Cell suspensions (1 \times 10⁵ cells/well) were added to the upper chamber. Bottom wells of the chamber were filled with DMEM medium containing 10% FBS as chemoattractant, whereas the upper chamber was filled with DMEM only. After incubation for 48 h at 37°C, the non-invading cells on the top of the membrane were removed with a cotton swab. Membrane containing invading-cells were fixed with methanol, washed three times with PBS and mounted with DAPI hard set (Vector Laboratories) onto glass slides for fluorescent microscopy.

Statistical analysis

Results are given as mean \pm S.E.M. Statistical analyses were performed by using Student's t-test as provided by Microsoft Excel.

Supporting Information

Figure S1 Study schema. (TIF)

Figure S2 miR-199a-5p and pri-miR-199a expression in C57BL/6 mice 14 days following bleomycin exposure. (A) Real-time PCR was performed to confirm the enhanced expression of miR-199a-5p in lungs of C57BL/6 and BALB/C mice 14 days following bleomycin exposure on an independent set of mice (n = 5 mice in each group). Data are expressed as mean \pm SEM. *p<0.05. (B) Pri-miR-199a-1 and pri-miR-199a-2 gene expression in lungs from C57BL/6 mice 14 days after bleomycin instillation. n=5 mice in each group, data are expressed as mean \pm SEM. *p<0.05 and **p<0.01. (TIF)

Figure S3 miR-21 expression during bleomycin induced lung fibrosis. (A) Normalized fluorescence expression values of miR-21 in lungs from Balb/c and C57BL/6 mice in response to bleomycin at the indicated time points from microarrays experiments (n = 3). Data are expressed as mean \pm SEM. **p<0.01 (B) Real-time

PCR was performed to confirm the enhanced expression of miR-21 in lungs of C57BL/6 and BALB/c mice 14 days following bleomycin exposure. $n = 5$ mice in each group, data are expressed as mean \pm SEM. $**p < 0.01$. (C) Paraffin sections were prepared from C57BL/6 mice harvested 14 days following bleomycin intratracheal instillation. In situ hybridization was performed to show the localization of miR-21 in fibrotic area of the lungs (i–iv). Results represent one out of three independently performed experiments.

(TIF)

Figure S4 CAV1 is a direct target of miR-199a-5p. Co-transfection of pre-miR-199a-5p or pre-miR-Neg and human CAV1 3'UTR-derived psiCHECK-2 construct in A549 cells show a significant decrease in normalized luciferase activity 48 h post-transfection. $*p < 0.05$.

(TIF)

Figure S5 Decreased CAV1 expression after transfection of MRC5 lung fibroblasts with pre-miR-199a-5p. (A) MRC5 Lung fibroblasts that were transfected with 10 nM of pre-miR-199a-5p for 48 h show a significant decrease in CAV1 expression as determined by real-time PCR. Data are expressed as mean \pm SEM. $**p < 0.01$. (B) Western blot analysis showing the downregulated expression of CAV1 protein after transfection of MRC-5 lung fibroblasts with pre-miR-199a-5p. Data are representative of two independent experiments.

(TIF)

Figure S6 MiR-199a-5p mediates TGF β dependent differentiation of lung fibroblast into myofibroblasts through CAV1 regulation. Normal human pulmonary fibroblasts MRC5 were transfected with a control LNA inhibitor (LNA-CT), a LNA-miR-199a-5p inhibitor or a target site blocker directed against CAV1 3-UTR (CAV1 protector) ($n = 2$). Protein samples were harvested at 48 h post-transfection and analyzed by western Blot for CAV1 and α SMA.

(TIF)

Figure S7 Pulmonary expression of CAV1 in BALB/c mice 14 days after bleomycin injection. Real-time PCR was performed to assess the expression of CAV1 in lungs of BALB/c mice 14 days following bleomycin exposure. $n = 5$ mice in each group, data are expressed as mean \pm SEM. n.s. = non significant.

(TIF)

Figure S8 MiR-199a-5p expression determined by qPCR using FFPE lung samples. Box plot showing the increased expression of miR-199a-5p in IPF samples ($n = 10$) compared to control ($n = 10$). Significance was evaluated using the Kruskal–Wallis rank-sum test. The box represents the 25–75% quartiles, the line in the box represents the median and whiskers represent the range.

(TIF)

Figure S9 Expression of *ACTA2* and *PPARG* following overexpression of miR-199a-5p in lung fibroblasts. Microarray analysis of lung fibroblasts transfected with 10 nM of miR-199a-5p mimic or miR-Neg reveals a significant increase of *ACTA2* expression ($*p < 0.05$), a hallmark of myofibroblast differentiation, as well as a significant decrease of *PPARG* expression ($**p < 0.01$), a known inhibitor of myofibroblast differentiation. Data are expressed as mean of normalized fluorescence values \pm SEM.

(TIF)

Figure S10 Comparison of transcriptomic changes induced by miR-199a-5p and a siRNA directed against CAV1. Normal human pulmonary fibroblasts hFL1 were transfected with pre-miR-Neg, pre-miR-199a-5p as well as siCAV1 or a control siRNA

($n = 2$). RNA samples were harvested at 48 h post-transfection and expression profiles were determined with pan genomic arrays. (A) Heatmap comparing the normalized log2 of the ratios between pre-miR-199a-5p versus pre-miR-Neg or siCAV1 versus siNeg signals. (B) Venn diagram comparing the set of down-regulated transcripts following miR-199a-5p and siCAV1. Cut-offs for selection are equal to 7.0 for the log₂ (signal), 0.7 for the log₂ (ratio), and 0.05 for the adjusted p-value.

(TIF)

Figure S11 Comparison of gene expression changes between miR-199a-5p-regulated genes in hFL1 human lungs fibroblasts and lungs from C57BL/6 mice 14 days after bleomycin injection. (A) Venn diagram showing the relationships of gene expression changes between miR-199a-5p transfected lung fibroblasts (two independent experiments) and lungs from C57BL/6 14 days after Bleomycin treatment ($n = 5$ mice). The numbers of genes whose expression was differentially detected in each condition at $p < 0.05$ are shown. Microarray analysis shows a significant reduction of *CAV2* (B), *TGFBR1* (C), *CCL2* (D), *ACTA2* (E) and *MMP3* (F) expression in C57BL/6 mice treated with bleomycin for 14 days ($n = 5$) compared with control mice ($n = 5$). Data are expressed as mean \pm SEM. $**p < 0.01$.

(TIF)

Figure S12 Profibrotic genes significantly modulated in lung fibroblasts by miR-199a-5p independently of CAV1 regulation. Lung fibroblasts were transfected by miR-199a-5p mimic, si-CAV1 or negative controls. Microarray analysis shows the expression of known profibrotic genes: *TGFBR1* (A), *MMP3* (B), *CAV2* (C), *PLAU* (D) and *CCL2* (E) 48 h after transfection. Data are expressed as mean \pm SEM. $*p < 0.05$, $**p < 0.01$.

(TIF)

Figure S13 Enhanced expression of miR-199a-5p in clinical samples from patients with liver fibrosis. *In situ* hybridization assay was performed to determine the localization of miR-199a-5p in normal and fibrotic human livers. Results represent one out of three independent experiments.

(TIF)

Figure S14 Expression of miR-199a-3p in lung fibrosis and impact of its overexpression on pulmonary fibroblast differentiation. (A) Increased expression of miR-199a-3p and miR-199a-5p in lung samples from IPF patients ($n = 10$) compared to control lung ($n = 10$). The mean normalized fluorescence intensity for the agilent probe is displayed; (B) Western blot analysis showing the effect of miR-199-5p or miR-199a-3p overexpression in hFL1 lung fibroblasts on SMAD4 and α SMA expression. One representative experiment out of two is shown.

(TIF)

Figure S15 Transfection of human lung fibroblasts with pre-miR-199a-5p or pre-miR-21 increases cell motility. Scratch wound was induced in confluent cell monolayers plated on plastic and wound closure was measured using image J software (2 independent experiments).

(TIF)

Figure S16 Effect of TGF β on mature and pri-miRNAs forms of miR-199a in human lung fibroblasts. hFL1 human fibroblasts were treated or not with 10 nM TGF β for 48 hours. Real Time TaqMan PCR showing the levels of (A) mature miR-199a-5p and miR-199a-3p; (B) pri-miR-199a-1 and pri-miR-199a-2. $n = 2$. Data are expressed as mean \pm SEM $*p < 0.05$.

(TIF)

Table S1 List of themes corresponding to “canonical pathways” annotations identified by Ingenuity Pathway Analysis in response to overexpression of miR-199a-5p or miR-21 in human pulmonary fibroblasts hFL1. Normal human pulmonary fibroblasts hFL1 were transfected with pre-miR-Neg, pre-miR-199a-5p or pre-miR-21 (n = 2). RNA samples were harvested at 48 h post-transfection and expression profiles were determined with whole genome microarrays. The probability to obtain the number of genes in a certain pathway in the list of differentially expressed genes between either miR-199a-5p or miR-21 versus miR-Neg was compared with the representation of the same pathway among all the genes on the microarray; $-\log_{10}$ of the Fisher’s exact probability is indicated. Significant pathways are shown in progressively brighter shades of orange according to their significance. ns = non significant. (DOCX)

Table S2 List of themes corresponding to “canonical pathways” annotations identified by Ingenuity Pathway Analysis in lungs from C57BL/6 mice treated with bleomycin. RNAs extracted from C57BL/6 mice lungs 14 days after instillation with bleomycin or PBS were analyzed with whole genome microarrays (n = 5). The probability to obtain the number of genes in a certain pathway in the list of differentially expressed genes between bleomycin and PBS conditions was compared with the representation of the same pathway among all the genes on the microarray; $-\log_{10}$ of the Fisher’s exact probability is indicated. (DOCX)

Table S3 Pulmonary expression of miR-199a-5p in 10 IPF and 10 controls (dataset GEO accession number GSE13316). (DOCX)

Table S4 List of the 133 genes modulated by miR-199a-5p in lung fibroblasts that are also dysregulated in lungs from C57BL/6 mice 14 days after bleomycin treatment. (DOCX)

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge the outstanding technical support of Brigitte Hémon, Vivianne Gnemmi, Belinda Ringot, Grégoire Savary, David Vargas Cardenas, the staff in the Histology Department at Lille’s University, and the excellent support of the Nice-Sophia Antipolis Functional Genomics Platform.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: N Pottier, B Mari, M Perrais, C Cauffiez, T Luedde, N Kaminski, C Roderburg. Performed the experiments: IS Henaoui, N Pottier, C Roderburg, S Aubert, E Courcot, J Milosevic, B Marcet, CL Lino Cardenas, F Glowacki, J-M Lo-Guidice, E Dewaeles. Analyzed the data: N Pottier, B Mari, P Barbry, N Kaminski, T Luedde, C Cauffiez, M Perrais, J Tedrow, J Milosevic, J Maurizio, M-C Copin. Contributed reagents/materials/analysis tools: B Wallaert, M-C Copin. Wrote the paper: N Pottier, B Mari, P Barbry, N Kaminski.

References

- Wynn TA (2007) Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. *J Clin Invest* 117: 524–529.
- Wilson MS, Wynn TA (2009) Pulmonary fibrosis: pathogenesis, etiology and regulation. *Mucosal Immunol* 2: 103–121.
- Kis K, Liu X, Hagood JS (2011) Myofibroblast differentiation and survival in fibrotic disease. *Expert Rev Mol Med* 13: e27.
- Wightman B, Ha I, Ruvkun G (1993) Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* 75: 855–862.
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75: 843–854.
- Griffiths-Jones S (2006) miRBase: the microRNA sequence database. *Methods Mol Biol* 342: 129–138.
- Sayed D, Abdellatif M (2011) MicroRNAs in development and disease. *Physiol Rev* 91: 827–887.
- Esquela-Kerscher A, Slack FJ (2006) Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* 6: 259–269.
- Sheedy FJ, O’Neill LA (2008) Adding fuel to fire: microRNAs as a new class of mediators of inflammation. *Ann Rheum Dis* 67 Suppl 3: iii50–iii55.
- O’Connell RM, Chaudhuri AA, Rao DS, Gibson WS, Balazs AB, et al. (2010) MicroRNAs enriched in hematopoietic stem cells differentially regulate long-term hematopoietic output. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 14235–14240.
- Hatley ME, Patrick DM, Garcia MR, Richardson JA, Bassel-Duby R, et al. (2010) Modulation of K-Ras-dependent lung tumorigenesis by MicroRNA-21. *Cancer Cell* 18: 282–293.
- Pichiorri F, Suh SS, Rocci A, De LL, Taccioli C, et al. (2010) Downregulation of p53-inducible microRNAs 192, 194, and 215 impairs the p53/MDM2 autoregulatory loop in multiple myeloma development. *Cancer Cell* 18: 367–381.
- Pandit KV, Corcoran D, Yousef H, Yarlagadda M, Tzouveleakis A, et al. (2010) Inhibition and role of let-7d in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 182: 220–229.
- Liu G, Friggeri A, Yang Y, Milosevic J, Ding Q, et al. (2010) miR-21 mediates fibrogenic activation of pulmonary fibroblasts and lung fibrosis. *J Exp Med* 207: 1589–1597.
- Thum T, Gross C, Fiedler J, Fischer T, Kissler S, et al. (2008) MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts. *Nature* 456: 980–984.
- Lawson WE, Blackwell TS, Gaudie J (2011) Let It Be: microRNAs Impact Interstitial Lung Disease. *Am J Respir Crit Care Med* 183: 1–2.
- Pandit KV, Milosevic J, Kaminski N (2011) MicroRNAs in idiopathic pulmonary fibrosis. *Transl Res* 157: 191–199.
- Drab M, Verkade P, Elger M, Kasper M, Lohn M, et al. (2001) Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice. *Science* 293: 2449–2452.
- Wang XM, Zhang Y, Kim HP, Zhou Z, Feghali-Bostwick CA, et al. (2006) Caveolin-1: a critical regulator of lung fibrosis in idiopathic pulmonary fibrosis. *J Exp Med* 203: 2895–2906.
- Shivshankar P, Brampton C, Miyasato S, Kasper M, Thannickal VJ, et al. (2012) Caveolin-1 Deficiency Protects from Pulmonary Fibrosis by Modulating Epithelial Cell Senescence in Mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 47: 28–36.
- Yamaguchi Y, Yasuoka H, Stolz DB, Feghali-Bostwick CA (2011) Decreased caveolin-1 levels contribute to fibrosis and deposition of extracellular IGFBP-5. *J Cell Mol Med* 15: 957–969.
- Schrier DJ, Kunkel RG, Phan SH (1983) The role of strain variation in murine bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am Rev Respir Dis* 127: 63–66.
- Haston CK, Amos CI, King TM, Travis EL (1996) Inheritance of susceptibility to bleomycin-induced pulmonary fibrosis in the mouse. *Cancer Res* 56: 2596–2601.
- Triboulet R, Mari B, Lin YL, Chable-Bessia C, Bennasser Y, et al. (2007) Suppression of microRNA-silencing pathway by HIV-1 during virus replication. *Science* 315: 1579–1582.
- Pottier N, Maurin T, Chevalier B, Puissegur MP, Lebrignand K, et al. (2009) Identification of keratinocyte growth factor as a target of microRNA-155 in lung fibroblasts: implication in epithelial-mesenchymal interactions. *PLoS ONE* 4: e6718. doi:10.1371/journal.pone.0006718
- Puissegur MP, Mazure NM, Bertero T, Pradelli L, Grosso S, et al. (2011) miR-210 is overexpressed in late stages of lung cancer and mediates mitochondrial alterations associated with modulation of HIF-1 activity. *Cell Death Differ* 18: 465–478.
- Zarjou A, Yang S, Abraham E, Agarwal A, Liu G (2011) Identification of a microRNA signature in renal fibrosis: Role of miR-21. *Am J Physiol Renal Physiol* 301: F793–801.
- Li S, Liang Z, Xu L, Zou F (2011) MicroRNA-21: a ubiquitously expressed pro-survival factor in cancer and other diseases. *Mol Cell Biochem* 360: 147–158.
- Le Brigand K, Robbe-Sermesant K, Mari B, Barbry P (2010) MiRonTop: mining microRNAs targets across large scale gene expression studies. *Bioinformatics* 26: 3131–3132.
- Xia H, Khalil W, Kahn J, Jessurun J, Kleidon J, et al. (2010) Pathologic caveolin-1 regulation of PTEN in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Pathol* 176: 2626–2637.
- Odajima N, Betsuyaku T, Nasuhara Y, Nishimura M (2007) Loss of caveolin-1 in bronchiolization in lung fibrosis. *J Histochem Cytochem* 55: 899–909.
- Tourkina E, Richard M, Gooz P, Bonner M, Pannu J, et al. (2008) Antifibrotic properties of caveolin-1 scaffolding domain in vitro and in vivo. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 294: L843–L861.
- Kim HP, Choi AM (2008) Caveolin-1 stops profibrogenic signaling? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 294: L841–L842.
- Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, et al. (2005) Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 15545–15550.

35. Lu J, Getz G, Miska EA, varez-Saavedra E, Lamb J, et al. (2005) MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 435: 834–838.
36. Zhang C (2008) MicroRNomics: a newly emerging approach for disease biology. *Physiol Genomics* 33: 139–147.
37. Xie T, Liang J, Guo R, Liu N, Noble PW, et al. (2011) Comprehensive microRNA analysis in bleomycin-induced pulmonary fibrosis identifies multiple sites of molecular regulation. *Physiol Genomics* 43: 479–487.
38. Ogawa T, Enomoto M, Fujii H, Sekiya Y, Yoshizato K, et al. (2012) MicroRNA-221/222 upregulation indicates the activation of stellate cells and the progression of liver fibrosis. *Gut* 61: 1600–1609.
39. Lize M, Pilarski S, Dobbelsstein M (2010) E2F1-inducible microRNA 449a/b suppresses cell proliferation and promotes apoptosis. *Cell Death Differ* 17: 452–458.
40. Marcet B, Chevalier B, Luxardi G, Coraux C, Zaragosi LE, et al. (2011) Control of vertebrate multiciliogenesis by miR-449 through direct repression of the Delta/Notch pathway. *Nat Cell Biol* 13: 693–699.
41. Yang H, Kong W, He L, Zhao JJ, O'Donnell JD, et al. (2008) MicroRNA expression profiling in human ovarian cancer: miR-214 induces cell survival and cisplatin resistance by targeting PTEN. *Cancer Res* 68: 425–433.
42. Chakrabarty A, Tranguch S, Daikoku T, Jensen K, Furneaux H, et al. (2007) MicroRNA regulation of cyclooxygenase-2 during embryo implantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 15144–15149.
43. Friedman LM, Dror AA, Mor E, Tenne T, Toren G, et al. (2009) MicroRNAs are essential for development and function of inner ear hair cells in vertebrates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 7915–7920.
44. Lin EA, Kong L, Bai XH, Luan Y, Liu CJ (2009) miR-199a, a bone morphogenic protein 2-responsive MicroRNA, regulates chondrogenesis via direct targeting to Smad1. *J Biol Chem* 284: 11326–11335.
45. Garzon R, Volinia S, Liu CG, Fernandez-Cymering C, Palumbo T, et al. (2008) MicroRNA signatures associated with cytogenetics and prognosis in acute myeloid leukemia. *Blood* 111: 3183–3189.
46. Iorio MV, Visone R, Di LG, Donati V, Petrocca F, et al. (2007) MicroRNA signatures in human ovarian cancer. *Cancer Res* 67: 8699–8707.
47. Ueda T, Volinia S, Okumura H, Shimizu M, Taccioli C, et al. (2010) Relation between microRNA expression and progression and prognosis of gastric cancer: a microRNA expression analysis. *Lancet Oncol* 11: 136–146.
48. Murakami Y, Toyoda H, Tanaka M, Kuroda M, Harada Y, et al. (2011) The progression of liver fibrosis is related with overexpression of the miR-199 and 200 families. *PLoS ONE* 6: e16081. doi:10.1371/journal.pone.0016081
49. Kanda T, Ishibashi O, Kawahigashi Y, Mishima T, Kosuge T, et al. (2010) Identification of obstructive jaundice-related microRNAs in mouse liver. *Hepatogastroenterology* 57: 1013–1023.
50. Severs NJ (1988) Caveolae: static in-pocketings of the plasma membrane, dynamic vesicles or plain artifact? *J Cell Sci* 90 (Pt 3): 341–348.
51. Williams TM, Lisanti MP (2004) The Caveolin genes: from cell biology to medicine. *Ann Med* 36: 584–595.
52. Chen YG, Wang XF (2009) A special issue on TGF-beta signaling. *Cell Res* 19: 1–2.
53. Zhang Y, Fan KJ, Sun Q, Chen AZ, Shen WL, et al. (2012) Functional screening for miRNAs targeting Smad4 identified miR-199a as a negative regulator of TGF-beta signalling pathway. *Nucleic Acids Res* 40: 9286–9297.
54. Swaisgood CM, French EL, Noga C, Simon RH, Ploplis VA (2000) The development of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice deficient for components of the fibrinolytic system. *Am J Pathol* 157: 177–187.
55. Bonniaud P, Margetts PJ, Kolb M, Schroeder JA, Kapoun AM, et al. (2005) Progressive transforming growth factor beta1-induced lung fibrosis is blocked by an orally active ALK5 kinase inhibitor. *Am J Respir Crit Care Med* 171: 889–898.
56. Yamashita CM, Dolgonos L, Zemans RL, Young SK, Robertson J, et al. (2011) Matrix Metalloproteinase 3 Is a Mediator of Pulmonary Fibrosis. *Am J Pathol* 179: 1733–1745.
57. Razani B, Wang XB, Engelman JA, Battista M, Lagaud G, et al. (2002) Caveolin-2-deficient mice show evidence of severe pulmonary dysfunction without disruption of caveolae. *Mol Cell Biol* 22: 2329–2344.
58. Kumarswamy R, Volkmann I, Thum T (2011) Regulation and function of miRNA-21 in health and disease. *RNA Biol* 8: 706–713.
59. Davis BN, Hilyard AC, Lagna G, Hata A (2008) SMAD proteins control DROSHA-mediated microRNA maturation. *Nature* 454: 56–61.
60. Davis BN, Hilyard AC, Nguyen PH, Lagna G, Hata A (2010) Smad proteins bind a conserved RNA sequence to promote microRNA maturation by Drosha. *Mol Cell* 39: 373–384.
61. Moore J, McKnight AJ, Simmonds MJ, Courtney AE, Hanvesakul R, et al. (2010) Association of caveolin-1 gene polymorphism with kidney transplant fibrosis and allograft failure. *JAMA* 303: 1282–1287.
62. Park HC, Yasuda K, Radliff B, Stoessel A, Sharkovska Y, et al. (2010) Postobstructive regeneration of kidney is derailed when surge in renal stem cells during course of unilateral ureteral obstruction is halted. *Am J Physiol Renal Physiol* 298: F357–F364.
63. Bataller R, Brenner DA (2005) Liver fibrosis. *J Clin Invest* 115: 209–218.
64. Pottier N, Chupin C, Defamie V, Cardinaud B, Sutherland R, et al. (2007) Relationships between early inflammatory response to bleomycin and sensitivity to lung fibrosis: a role for dipeptidyl-peptidase I and tissue inhibitor of metalloproteinase-3? *Am J Respir Crit Care Med* 176: 1098–1107.
65. Roderburg C, Urban GW, Bettermann K, Vucur M, Zimmermann H, et al. (2011) Micro-RNA profiling reveals a role for miR-29 in human and murine liver fibrosis. *Hepatology* 53: 209–218.
66. Demedts M, Costabel U (2002) ATS/ERS international multidisciplinary consensus classification of the idiopathic interstitial pneumonias. *Eur Respir J* 19: 794–796.
67. Steele MP, Speer MC, Loyd JE, Brown KK, Herron A, et al. (2005) Clinical and pathologic features of familial interstitial pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 172: 1146–1152.
68. Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van DS, Bateman A, Enright AJ (2006) miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res* 34: D140–D144.
69. Wu W, Dave N, Tseng GC, Richards T, Xing EP, et al. (2005) Comparison of normalization methods for CodeLink Bioarray data. *BMC Bioinformatics* 6: 309.
70. Le BK, Barbry P (2007) Mediente: a web-based microarray data manager. *Bioinformatics* 23: 1304–1306.
71. Mootha VK, Lindgren CM, Eriksson KF, Subramanian A, Sihag S, et al. (2003) PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat Genet* 34: 267–273.
72. van DS, breu-Goodger C, Enright AJ (2008) Detecting microRNA binding and siRNA off-target effects from expression data. *Nat Methods* 5: 1023–1025.
73. Rosenbloom J, Castro SV, Jimenez SA (2010) Narrative review: fibrotic diseases: cellular and molecular mechanisms and novel therapies. *Ann Intern Med* 152: 159–166.

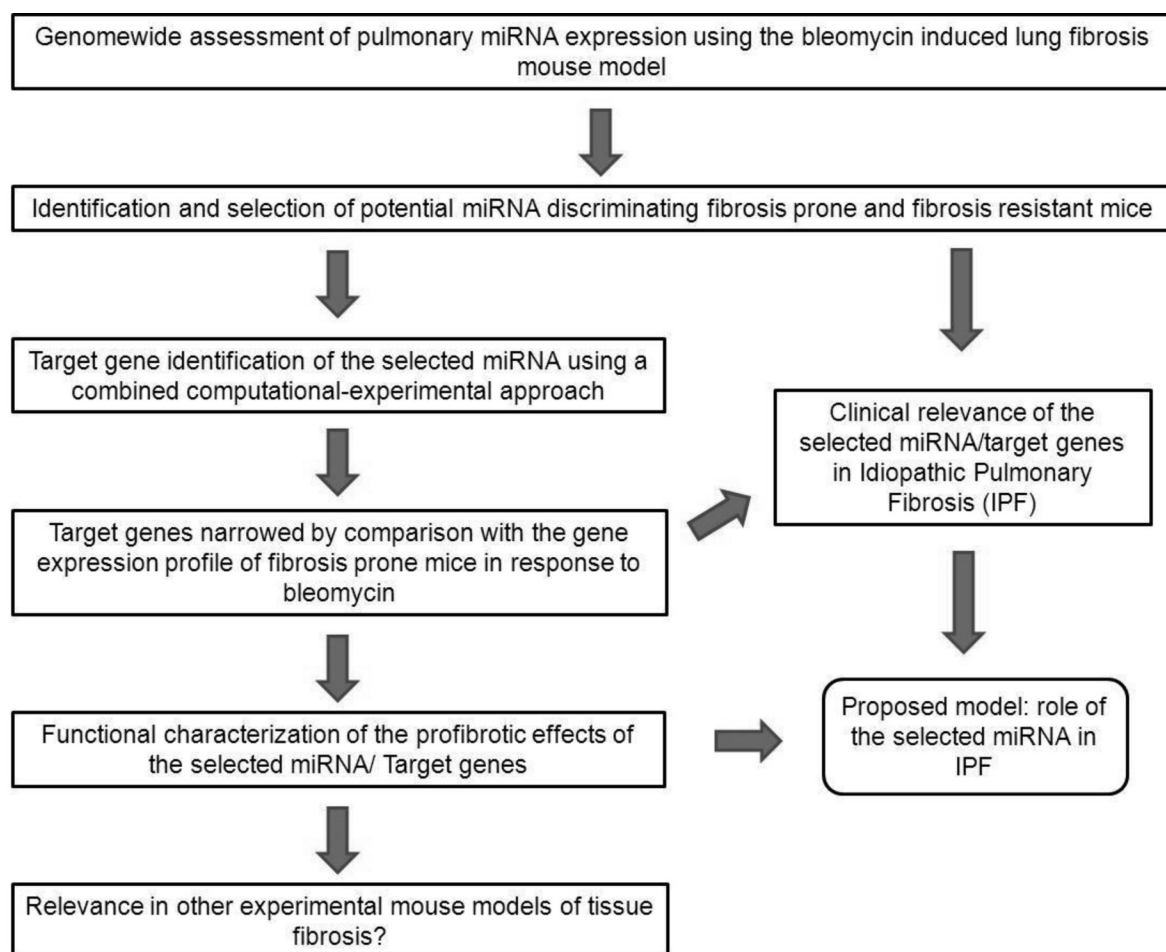


Figure S1

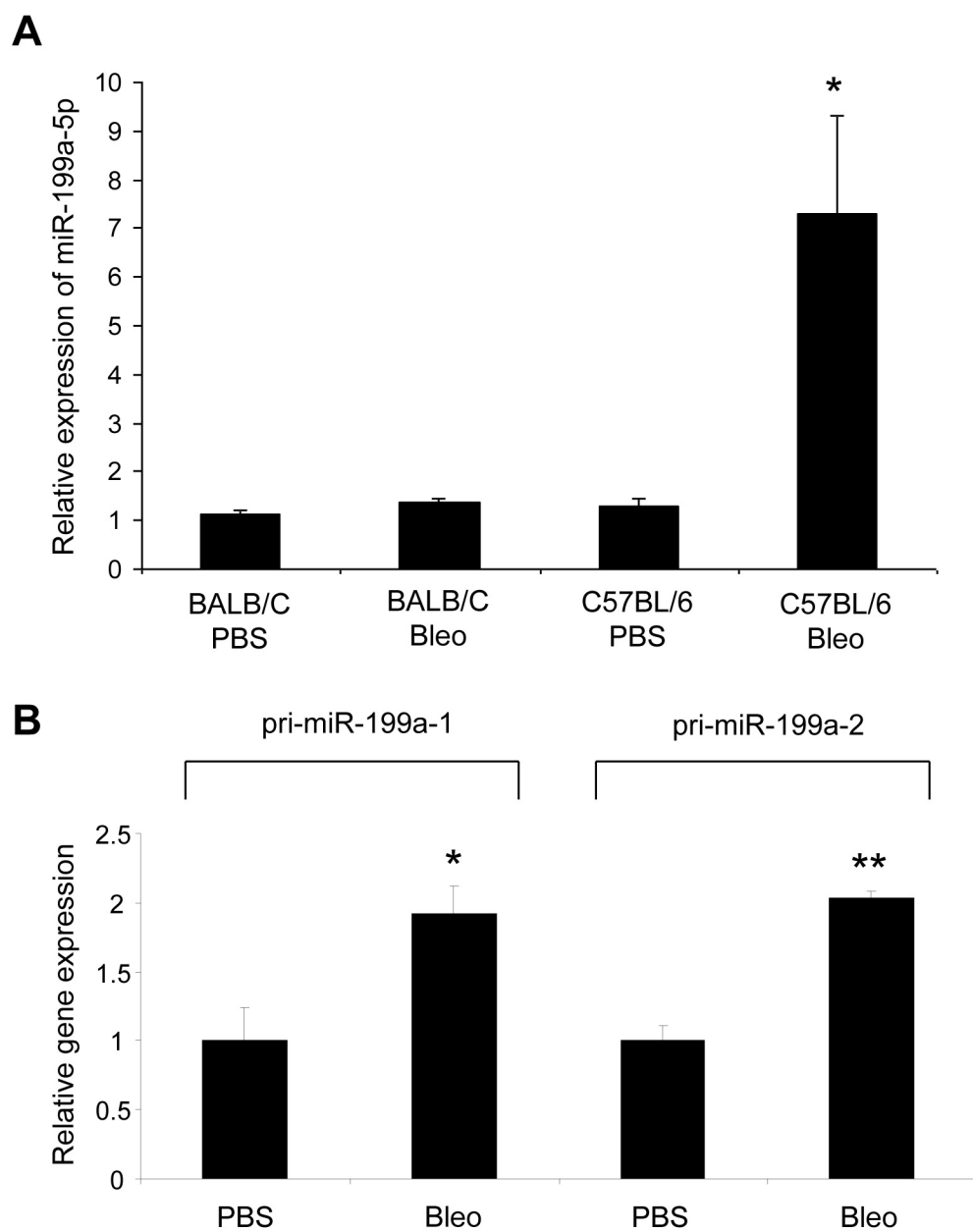


Figure S2

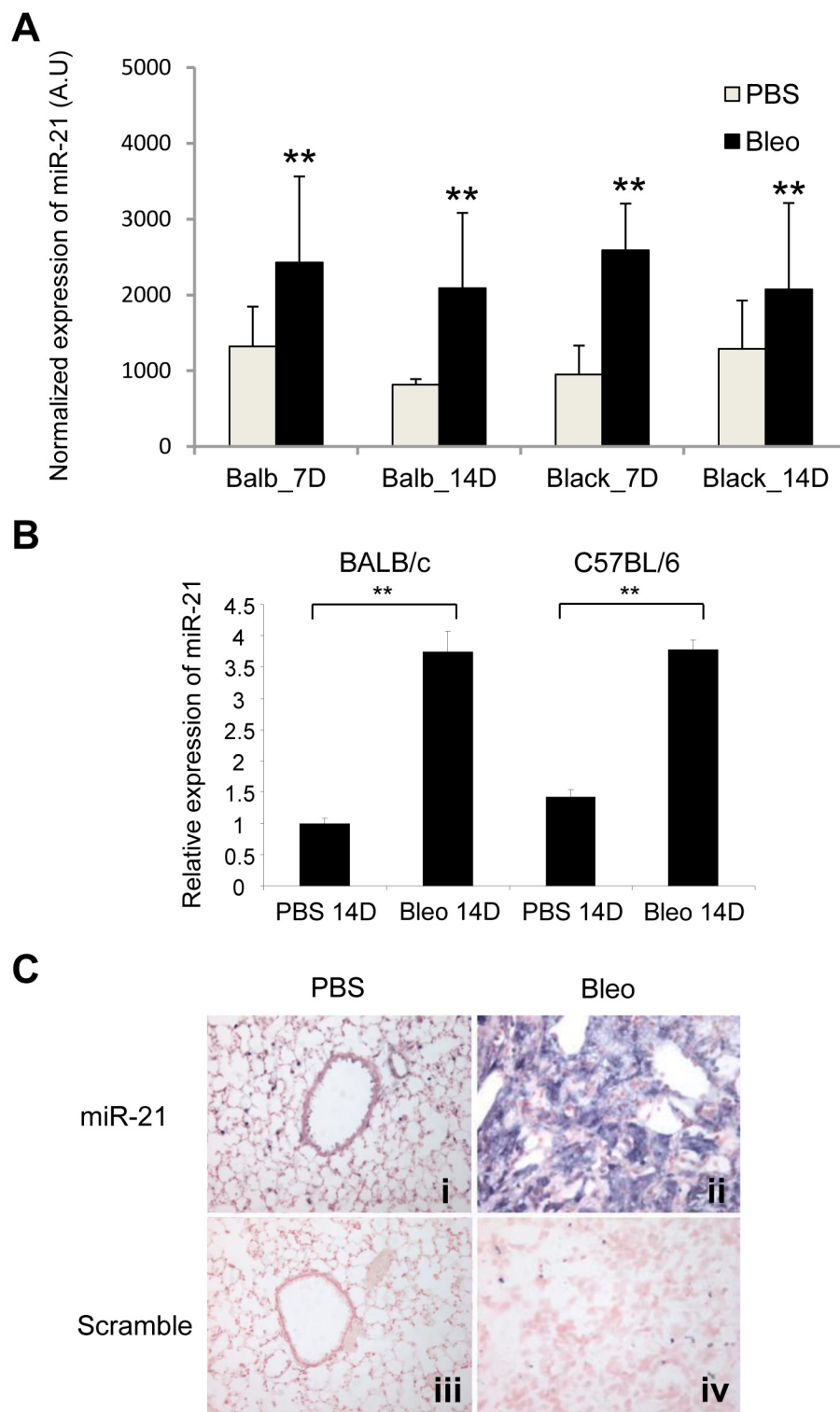


Figure S3

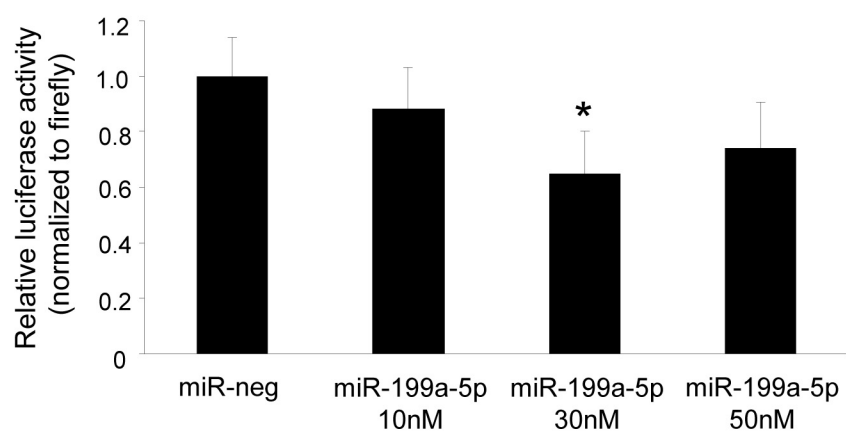


Figure S4

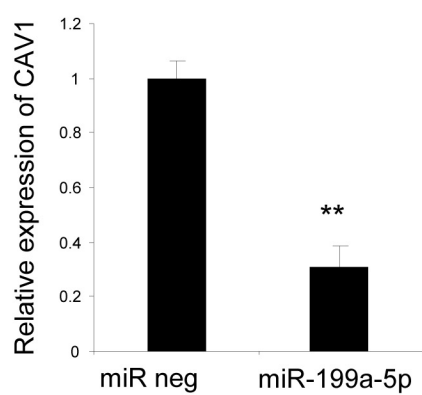
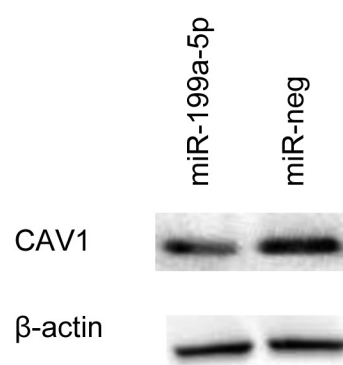
A**B**

Figure S5

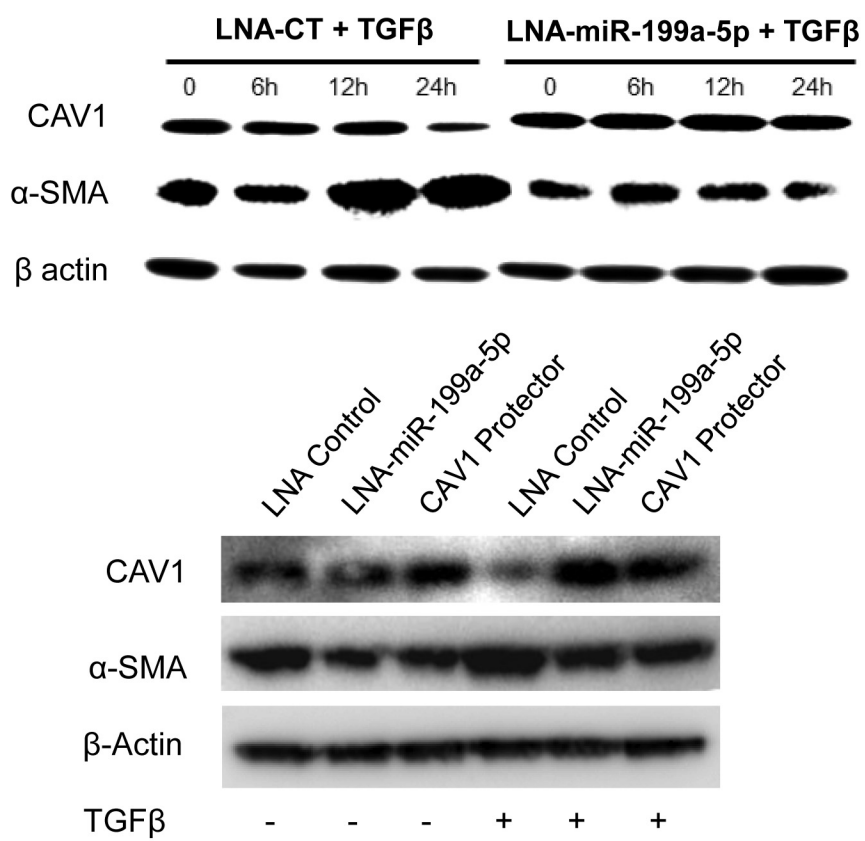


Figure S6

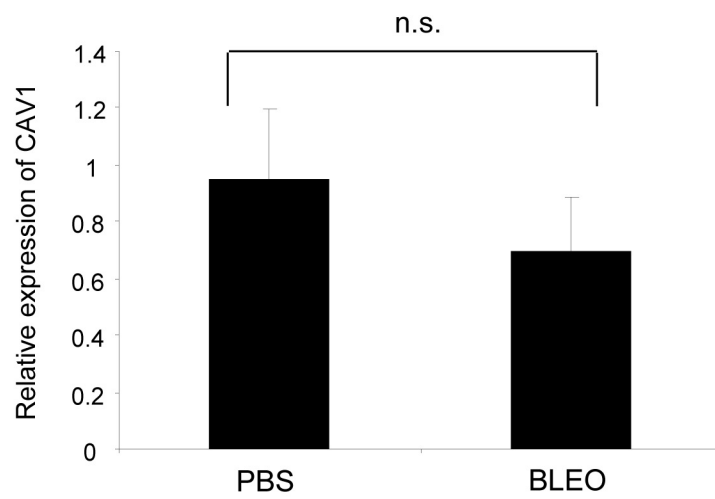


Figure S7

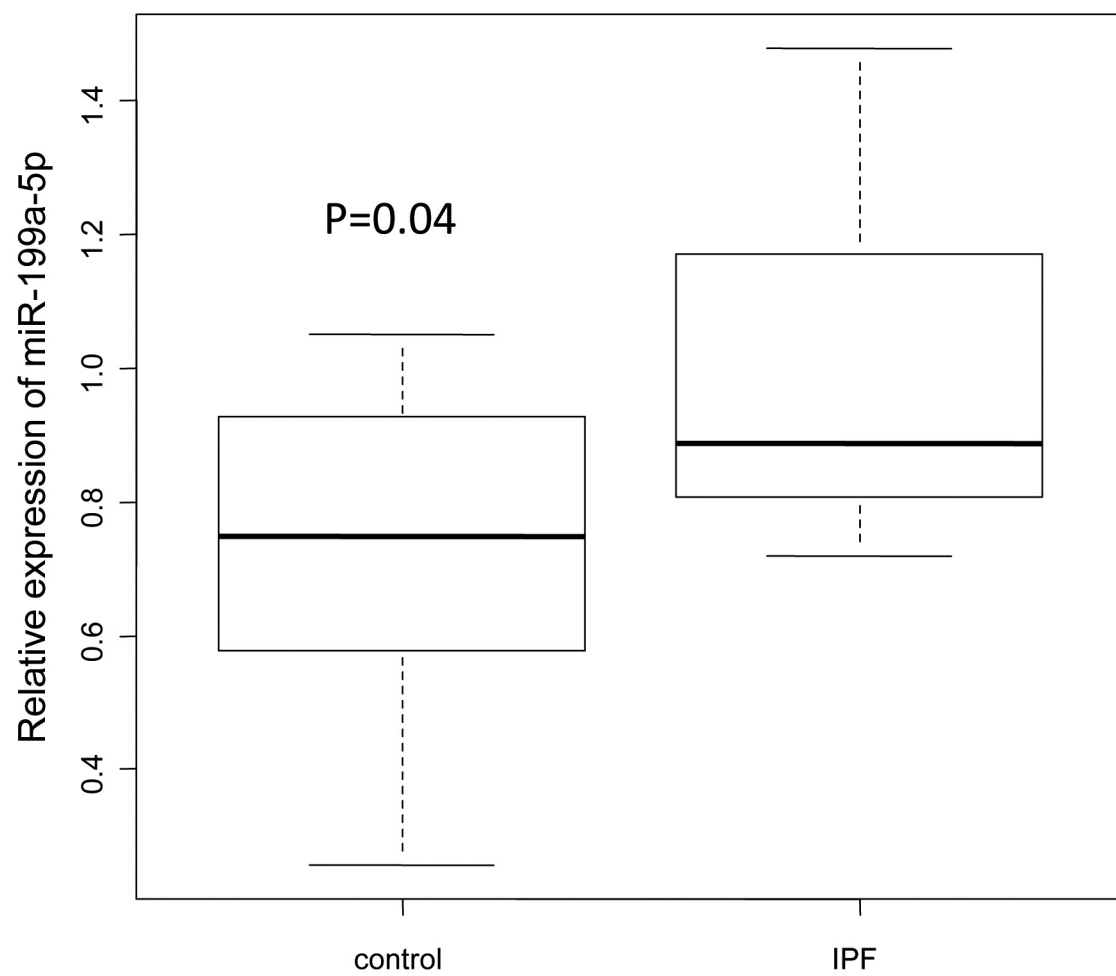


Figure S8

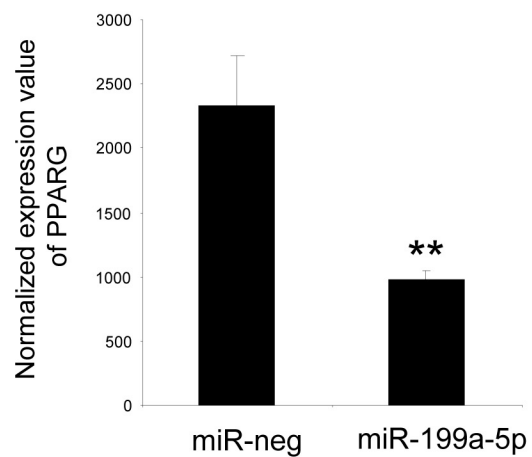
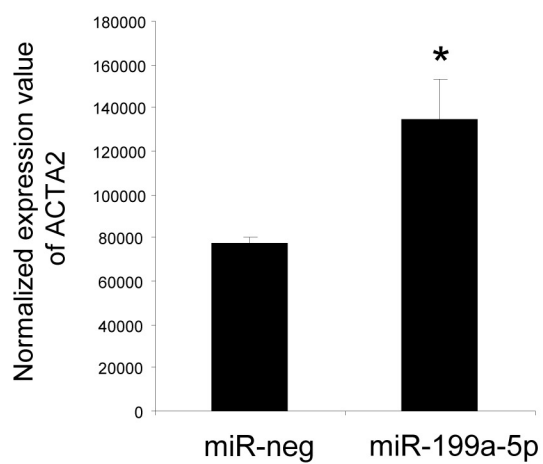


Figure S9

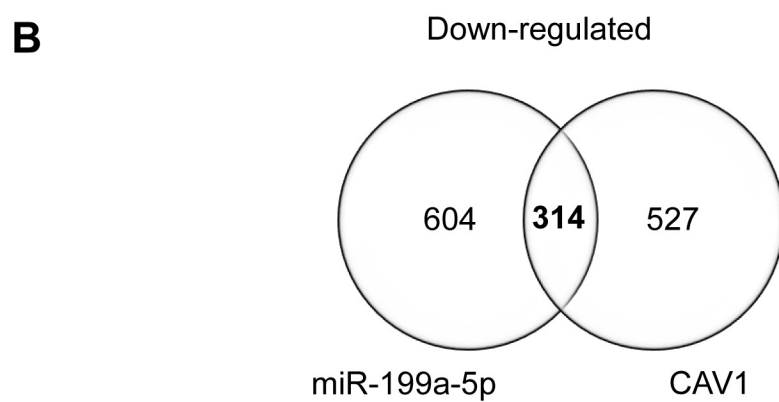
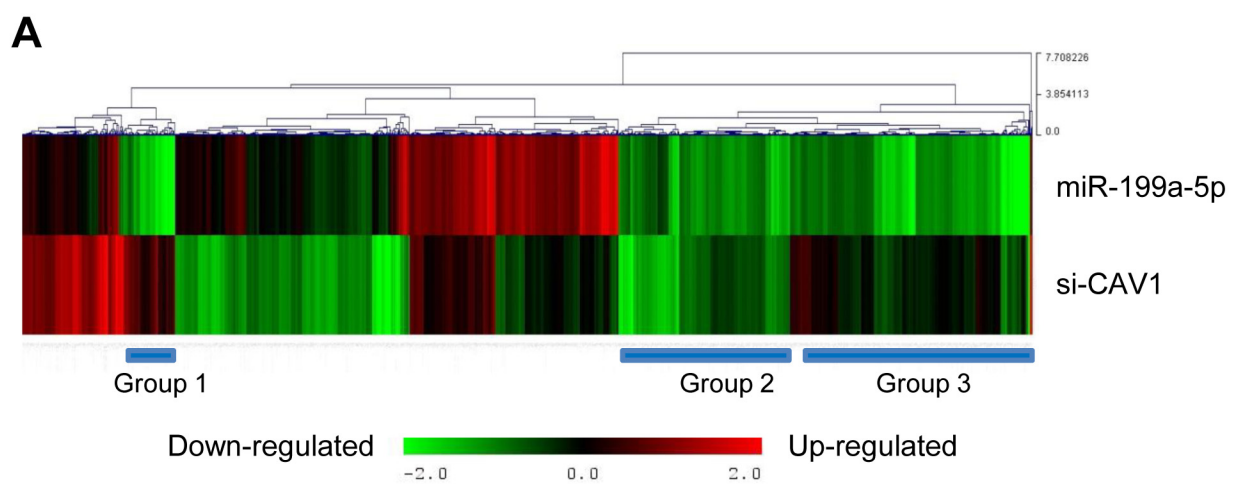


Figure S10

A

Lung fibrosis

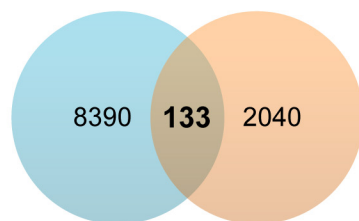
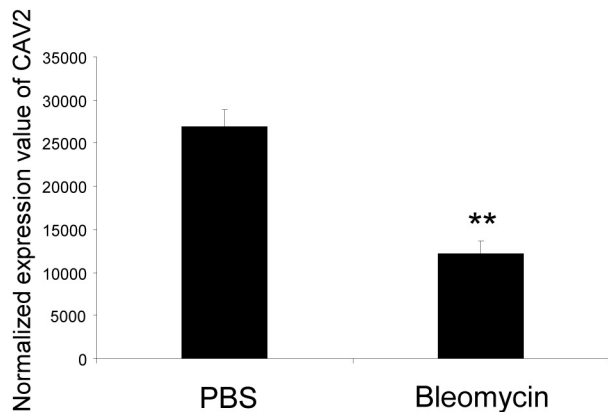
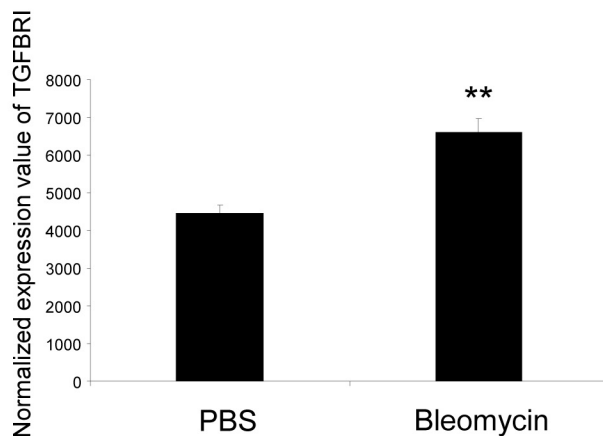
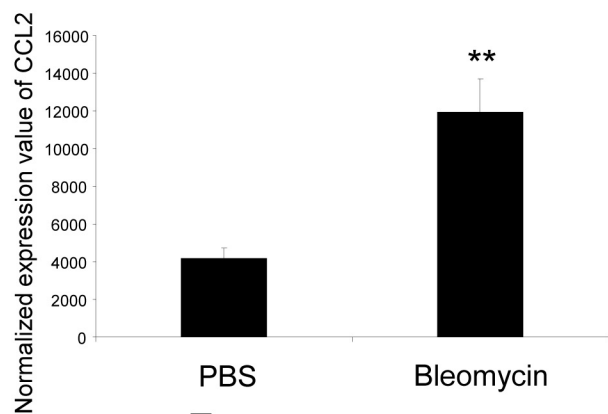
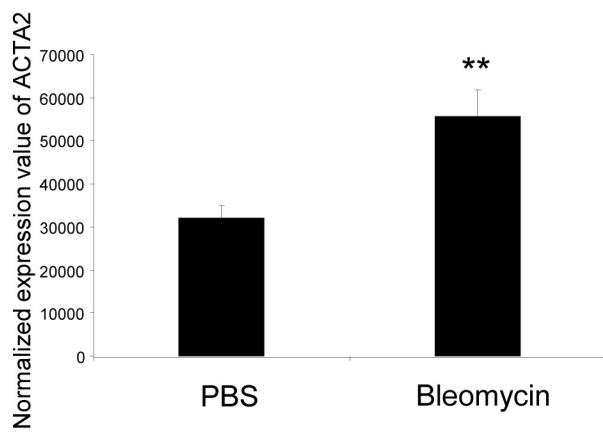
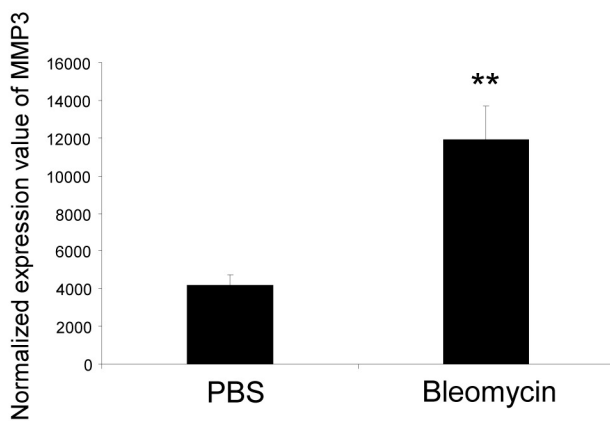
miR-199a-5p transfected
lung fibroblasts**B****C****D****E****F**

Figure S11

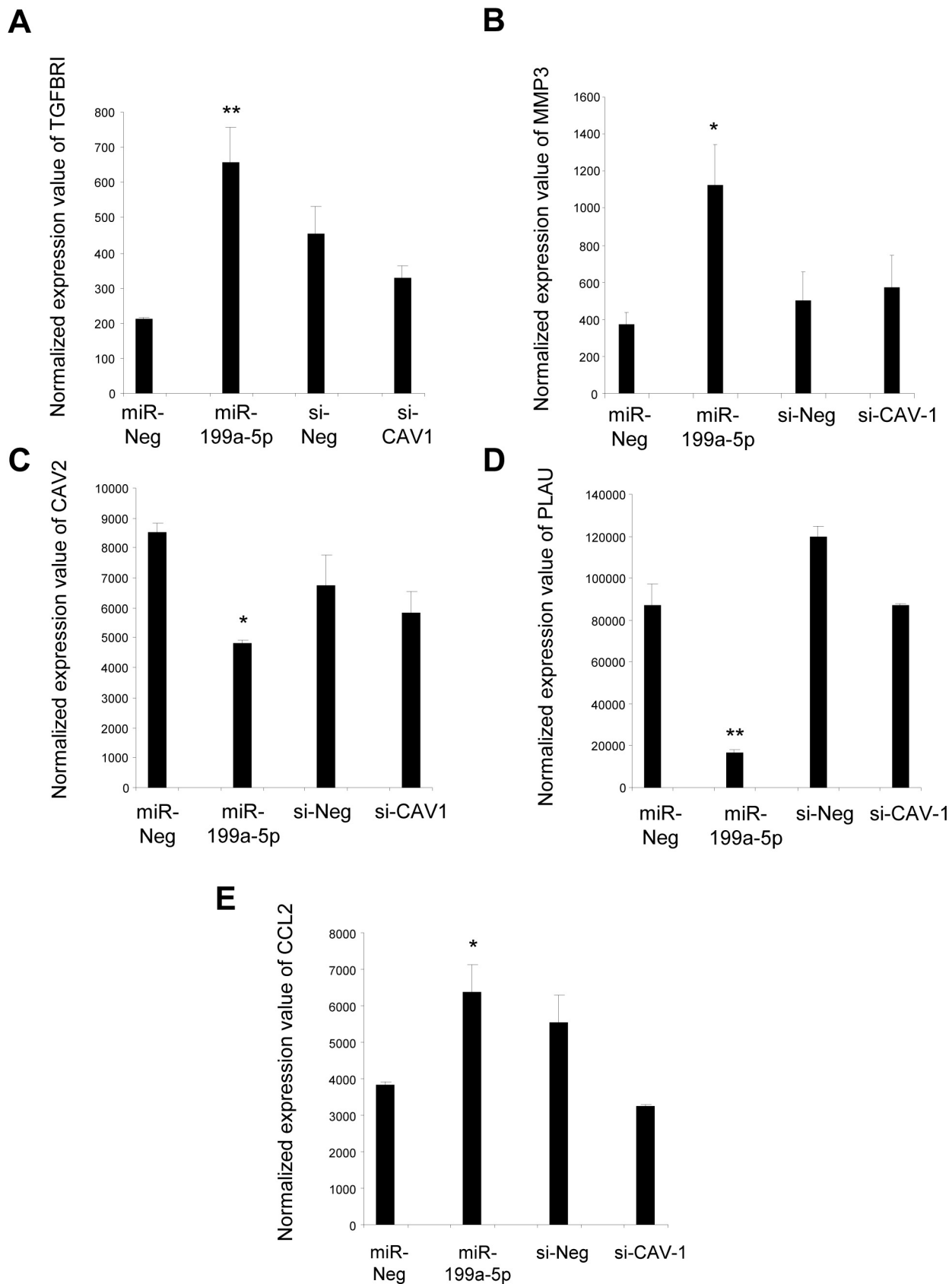
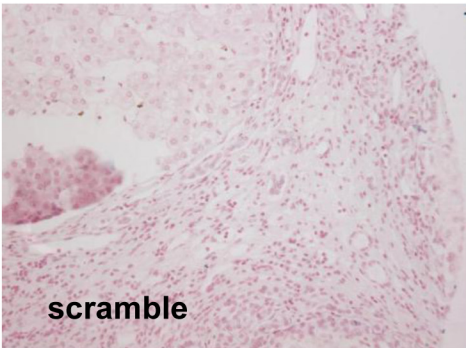
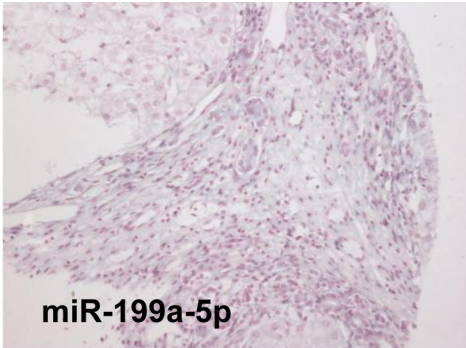


Figure S12

Liver Fibrosis



Normal liver

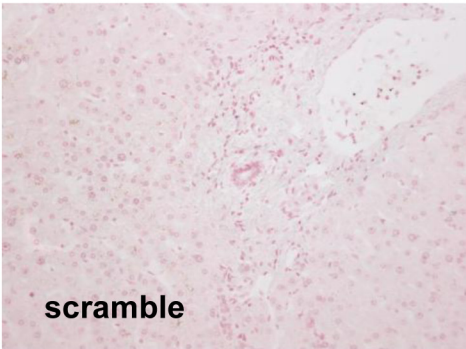
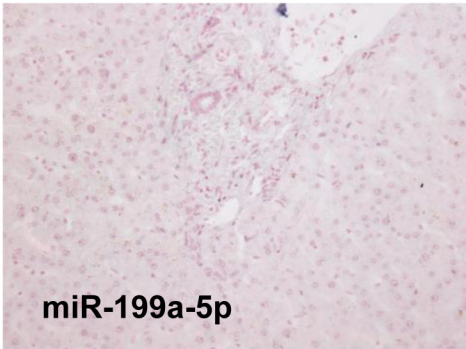
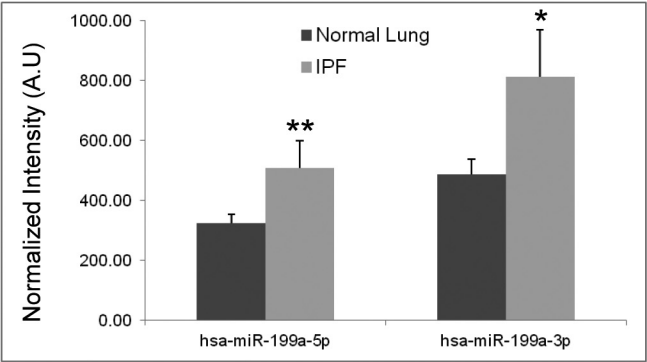


Figure S13

A



B

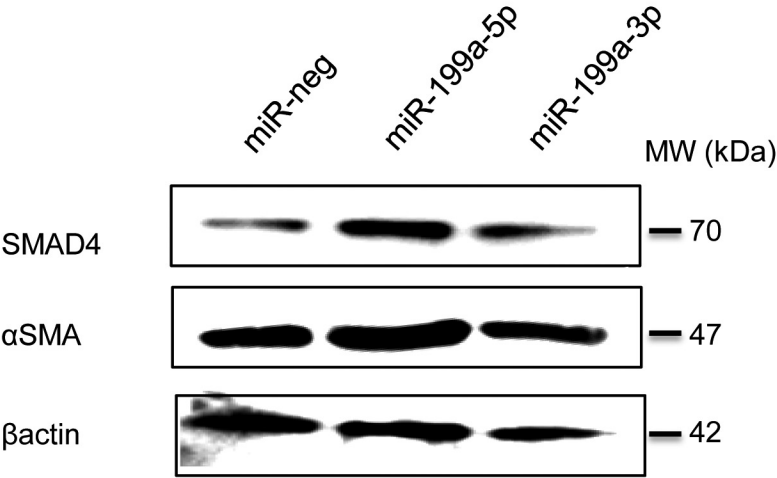


Figure S14

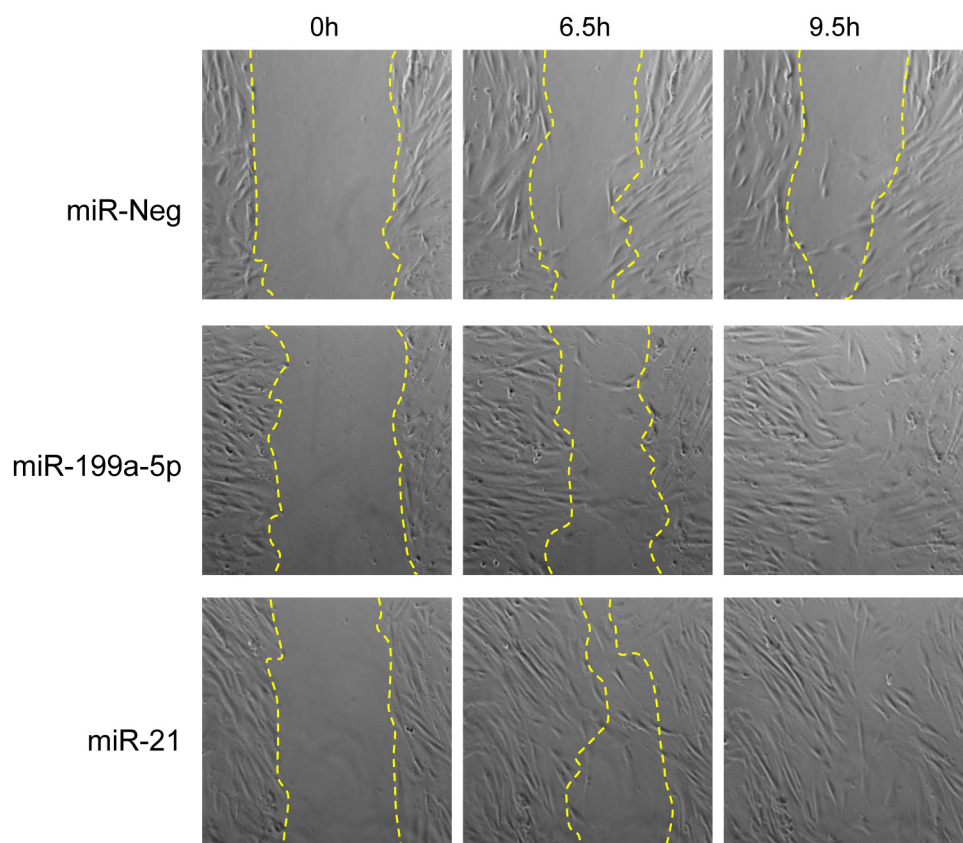
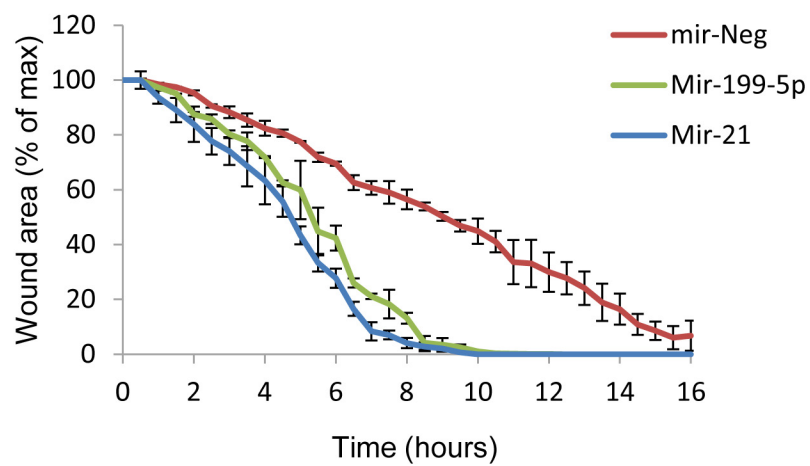


Figure S15

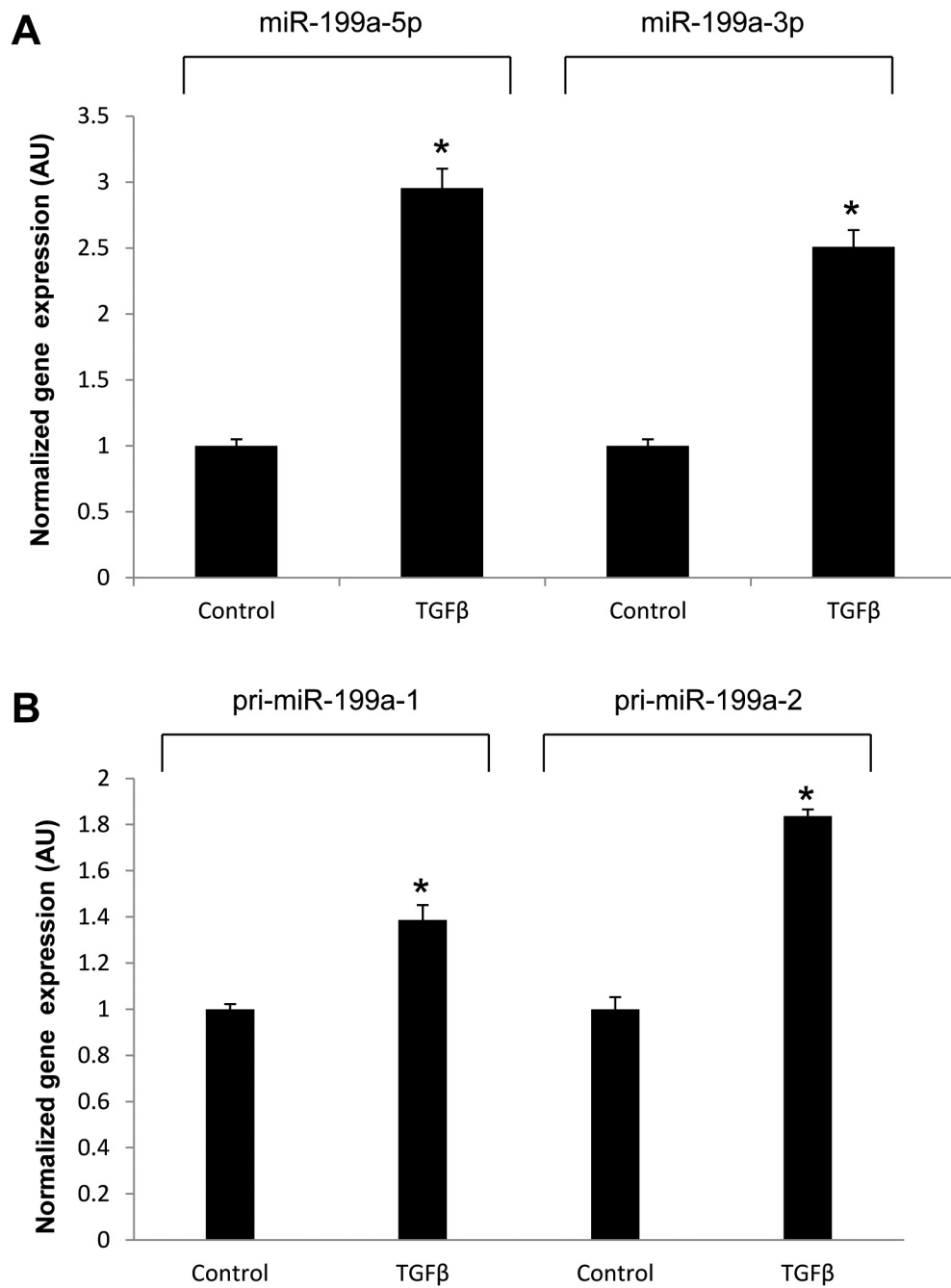


Figure S16

Ingenuity Canonical Pathways	miR-199a-5p	miR-21
Acute Phase Response Signaling	2.39	ns
April Mediated Signaling	2.52	ns
ATM Signaling	ns	4.69
Biosynthesis of Steroids	6.94	ns
Caveolar-mediated Endocytosis Signaling	1.46	ns
Cell Cycle Control of Chromosomal Replication	ns	6.84
Cell Cycle: G1/S Checkpoint Regulation	4.06	3.71
Cell Cycle: G2/M DNA Damage Checkpoint Regulation	ns	7.71
Cyclins and Cell Cycle Regulation	3.03	6.55
Death Receptor Signaling	1.74	1.21
DNA Double-Strand Break Repair by Homologous Recombination	ns	2.86
Fatty Acid Metabolism	1.31	ns
GNRH Signaling	1.74	ns
IL-1 Signaling	2.63	ns
IL-10 Signaling	2.13	ns
IL-12 Signaling and Production in Macrophages	2.28	ns
IL-15 Signaling	1.59	ns
IL-17A Signaling in Airway Cells	2.16	ns
IL-17A Signaling in Fibroblasts	ns	2.75
IL-6 Signaling	1.89	ns
Integrin Signaling	1.87	ns
LPS-stimulated MAPK Signaling	2.45	ns
Mismatch Repair in Eukaryotes	ns	3.96
Mitotic Roles of Polo-Like Kinase	1.22	9.15
Molecular Mechanisms of Cancer	1.74	1.41
NF- κ B Signaling	3.03	ns
Nur77 Signaling in T Lymphocytes	1.57	ns
p38 MAPK Signaling	2.79	ns
p53 Signaling	1.78	ns
Pantothenate and CoA Biosynthesis	1.71	ns
Parkinson's Signaling	2.04	ns
Phospholipase C Signaling	1.57	ns
PKC Signaling in T Lymphocytes	2.12	ns
PPAR Signaling	1.53	ns
Production of Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species in Macrophages	1.68	ns
Protein Ubiquitination Pathway	ns	1.50
PTEN Signaling	2.70	ns
Purine Metabolism	1.69	ns
Pyrimidine Metabolism	1.52	1.19
Role of BRCA1 in DNA Damage Response	ns	5.61
Role of CHK Proteins in Cell Cycle Checkpoint Control	ns	6.07
Role of JAK family kinases in IL-6-type Cytokine Signaling	1.60	ns
Role of NFAT in Cardiac Hypertrophy	2.65	ns
Role of PKR in Interferon Induction and Antiviral Response	1.68	ns
Small Cell Lung Cancer Signaling	2.45	2.22
TGF- β Signaling	2.22	1.41

TWEAK Signaling	2.04	1.07
Type I Diabetes Mellitus Signaling	1.82	ns
Type II Diabetes Mellitus Signaling	2.14	ns
Valine, Leucine and Isoleucine Degradation	1.56	ns
Wnt/ β -catenin Signaling	2.41	ns

Ingenuity Canonical Pathways	-log(p-value)	Molecules
Hepatic Fibrosis / Hepatic Stellate Cell Activation	6.63	CCR5, CTGF, FN1, EDNRB, LEPR, FGFR2, MMP13, MYH7, MMP2, IL6, PDGFC, PGF, FGF1, VEGFA, CCL2, IGF1, TIMP1, KDR, IGFBP3, LAMA1, TNFRSF1B, COL3A1
Bladder Cancer Signaling	3.98	CDKN2A, MMP14, MMP15, MMP10, MMP13, MMP2, PDGFC, PGF, FGF1, VEGFA, MMP8, CDKN1A, MMP12
Complement System	3.66	CFB, CFI, C1QC, C1QA, C5, C1QB, C3AR1
LPS/IL-1 Mediated Inhibition of RXR Function	3.47	GSTA3, PPARA, APOE, GAL3ST2, GSTM5, MGMT, IL4I1, APOC2, CHST1, MAOB, Gstm3, CAT, SLC27A6, GSTM4, FABP1, FABP7, FMO1, PLTP, CYP2B6, TNFRSF1B
Cell Cycle: G2/M DNA Damage Checkpoint Regulation	3.23	CDKN2A, CDKN1A, CKS1B, TOP2A, CCNB2, PLK1, SFN, CDK1
Atherosclerosis Signaling	3.11	MSR1, CCL2, CXCL12, LPL, PLA2G1B, MMP13, IL6, CCR2, COL18A1, PLA2G7, PDGFC, COL3A1
Role of Macrophages, Fibroblasts and Endothelial Cells in Rheumatoid Arthritis	2.83	TLR1, SOCS3, WNT10B, FN1, FRZB, NFKBIE, MMP13, IL6, PLCH2, PDGFC, FCGR1A, PGF, VEGFA, ROR2, CCL2, DKK2, TNFRSF1B, NOS2, FCGR3A, ADAMTS4, C5, WNT10A, CXCL12, Tlr13, SFRP1
LXR/RXR Activation	2.73	APOE, MSR1, CCL2, CCL7, LPL, APOC2, PLTP, IL6, TNFRSF1B, NOS2
Role of Osteoblasts, Osteoclasts and Chondrocytes in Rheumatoid Arthritis	2.66	ACP5, CTSK, WNT10B, SPP1, FRZB, NFKBIE, MMP14, SMAD6, MMP13, IL6, IGF1, WNT10A, MMP8, CALCR, DKK2, SFRP1, TNFRSF1B, BMP6, BMP1, ADAMTS4
Mitotic Roles of Polo-Like Kinase	2.35	CDC20, PLK3, PPM1L, PRC1, CCNB2, PLK1, Ccnb1/Gm5593, CDK1
HIF1 Signaling	2.29	VEGFA, MMP14, MMP8, MMP15, MMP10, MMP13, MMP2, MMP12, NOS2, PDGFC, PGF
Role of IL-17F in Allergic Inflammatory Airway Diseases	2.13	CXCL10, IGF1, CCL2, CCL7, MMP13, IL6
TREM1 Signaling	2.11	TLR1, CCL2, CCL7, Tlr13, CD86, IL6, FCGR2B
Role of Pattern Recognition Receptors in Recognition of Bacteria and Viruses	2.09	PTX3, TLR1, C1QC, C1QA, C5, C1QB, IL6, Oas1f, C3AR1
Eicosanoid Signaling	1.81	PTGS1, PLA2G1B, FPR2, HPGDS, TBXAS1, PLA2G7, DPEP2
Acute Phase Response Signaling	1.76	SOCS3, ITIH3, FN1, NFKBIE, SAA2, SERPINA3, C5, IL6, HMOX1, ITIH4, CFB, TNFRSF1B, SERPINE1, SAA1
Dendritic Cell Maturation	1.74	FCGR2A, LEPR, NFKBIE, CD86, IL6, FCGR2B, TNFRSF1B, COL18A1, TREM2, FCGR1A, FCGR3A, COL3A1
G-Protein Coupled Receptor Signaling	1.72	CCR5, HTR2B, NFKBIE, PDE1A, PDE4D, ADRB3, ADRB1, GPR116, CCRL2, GPR37, GPR85, CCRL1, CCR2, BAI2, DARCC, APLNR, S1PR5, EDNRB, GPR84, FPR2, RGS16, RGS4, GPR176, CD97, P2RY14, CXCR7, P2RY6, PTH1R, GPR65, CALCR, PDE8B, EMR1, C3AR1
IL-17A Signaling in Fibroblasts	1.72	CCL2, CCL7, NFKBIE, LCN2, IL6
p53 Signaling	1.69	CDKN2A, PLAGL1, GADD45G, CDKN1A, SERPINB5, PIDD, SFN, BIRC5, SERPINE2

Colorectal Cancer Metastasis Signaling	1.69	TLR1, WNT10B, ADRBK2, MMP14, MMP15, MMP10, MMP13, MMP2, IL6, PDGFC, PGF, BIRC5, VEGFA, WNT10A, MMP8, Tlr13, MMP12, NOS2
IL-10 Signaling	1.49	HMOX1, SOCS3, CCR5, FCGR2A, NFKBIE, IL6, FCGR2B
Role of Hypercytokinemia/hyperchemokine-mia in the Pathogenesis of Influenza	1.47	CXCL10, CCR5, CCL2, IL6
Intrinsic Prothrombin Activation Pathway	1.47	KNG1, F10, COL18A1, COL3A1
Airway Pathology in Chronic Obstructive Pulmonary Disease	1.42	MMP8, MMP2
Aryl Hydrocarbon Receptor Signaling	1.42	CDKN2A, GSTA3, CTSD, CCNA2, CCNE1, GSTM5, TFF1, Gstm3, CDKN1A, GSTM4, IL6
Serotonin Receptor Signaling	1.37	MAOB, HTR2B, IL4I1, SLC6A4
Xenobiotic Metabolism Signaling	1.33	GSTA3, GAL3ST2, GSTM5, MGMT, IL4I1, IL6, Ces1e, HMOX1, CHST1, MAOB, Gstm3, CAT, PPM1L, CAMK1G, GSTM4, FMO1, CYP2B6, NOS2
Pathogenesis of Multiple Sclerosis	1.30	CXCL10, CCR5
Pancreatic Adenocarcinoma Signaling	1.29	VEGFA, CDKN2A, HMOX1, CCNE1, PLD3, CDKN1A, PDGFC, PGF, BIRC5
Tryptophan Metabolism	1.27	BDH2, CYP2F1, MAOB, CYP7B1, MGMT, CAT, IL4I1, CYP2B6, INMT, Aox3
Cyclins and Cell Cycle Regulation	1.24	CDKN2A, CCNA2, CCNE1, PPM1L, CDKN1A, CCNB2, CDK1
Phospholipid Degradation	1.19	HMOX1, PLD3, PLA2G1B, DGKG, PLCH2, PLA1A, PLA2G7
Nitrogen Metabolism	1.15	CA14, CA4, CA13, CA8
T Helper Cell Differentiation	1.15	FOXP3, CD86, IL2RA, IL6, TNFRSF1B, GATA3
Glutathione Metabolism	1.10	GSTA3, GSTM5, Gstm3, GSTM4, HPGDS
ATM Signaling	1.07	SMC2, GADD45G, CDKN1A, CCNB2, CDK1
Communication between Innate and Adaptive Immune Cells	1.05	CXCL10, TLR1, Tlr13, CD86, IL6, Ccl9
FXR/RXR Activation	1.05	PPARA, APOE, PON1, MLXIPL, FOXA1, APOC2, PLTP
Neuroprotective Role of THOP1 in Alzheimer's Disease	1.05	KNG1, PDYN, NTS, SERPINA3
Role of IL-17A in Arthritis	1.04	CCL2, CCL7, NFKBIE, MMP13, NOS2
Chemokine Signaling	1.03	CCR5, CCL13, CCL2, CCL7, CXCL12, CAMK1G

Probe ID	miRNA name	control ^a	IPF ^a	Ratio ^b	p-value ^c
A_25_P00010700	hsa-miR-199a-5p	8.38	8.69	1.24	0.006
A_25_P00010701	hsa-miR-199a-5p	6.31	6.69	1.30	0.005
A_25_P00010069	hsa-miR-199a-3p	8.97	9.47	1.41	0.015
A_25_P00010068	hsa-miR-199a-3p	7.89	8.19	1.23	0.045

^amedian expression; ^bIPF vs.control; ^cWilcoxon rank sum test

Gene Symbol	miR-199a-5p transfected lung fibroblasts			bleomycin induced lung fibrosis		
	Average intensity	Log Ratio	p-value	Average intensity	Log Ratio	p-value
ADAMTS4	10.87	0.77	0.037205	9.02	3.17	0.000044
AKAP7	9.57	-1.59	0.002165	12.05	-1.07	0.001094
ANAPC13	12.52	-1.22	0.001805	15.47	-0.47	0.034385
AOX1	11.46	-1.69	0.000211	12.48	-0.98	0.001395
ARAP3	11.96	-0.70	0.027772	10.49	-1.28	0.000042
ARHGAP12	11.29	-2.00	0.010078	10.52	-0.85	0.000414
ASGR1	9.08	-0.99	0.012113	9.12	-3.12	0.000005
ASPH	13.01	-1.43	0.029179	12.21	-0.44	0.002034
ATP9A	13.11	-1.20	0.008302	16.02	-0.36	0.049043
BTRC	9.16	-1.39	0.004120	10.11	-0.54	0.014927
CABYR	10.57	0.94	0.041231	7.21	1.32	0.003024
CACNB3	10.68	0.72	0.048016	10.44	0.97	0.000449
CAV1	15.73	-1.71	0.005572	11.76	-1.03	0.002899
CAV2	12.60	-0.92	0.025258	14.01	-1.20	0.001986
CCNA2	11.73	0.94	0.022863	10.95	2.20	0.000330
CCNB2	14.79	0.89	0.015840	11.52	1.84	0.000200
CDH2	14.14	-1.96	0.000123	10.48	-0.54	0.027403
CDKN1B	11.99	-0.84	0.018487	13.08	-0.90	0.017326
CDKN3	10.76	0.90	0.026616	8.65	1.88	0.000218
CDT1	12.14	1.00	0.038265	11.65	0.87	0.005190
CENPA	11.43	0.83	0.045218	10.73	1.23	0.003830
CENPH	10.83	1.06	0.011271	8.43	1.71	0.000086
CENPN	13.62	0.76	0.023514	7.52	1.06	0.015405
CHAF1A	13.01	0.91	0.010525	9.30	0.81	0.003431
CHCHD10	11.89	-1.15	0.015618	16.97	-0.92	0.001257
CHTF18	11.97	0.67	0.048768	9.41	1.02	0.014577
CTF1	10.88	-0.69	0.039451	10.65	-0.41	0.025602
CTNND1	10.78	-0.74	0.023539	15.01	-0.72	0.002786
CYB5B	8.30	-0.94	0.023676	13.70	-0.72	0.009805
CYP2S1	7.54	-2.00	0.000431	15.16	-0.79	0.002440
CYTL1	7.96	-1.23	0.008807	11.05	-1.54	0.000494
DALRD3	10.58	-0.86	0.040702	9.06	-0.61	0.037489
DDX58	9.73	-1.72	0.014459	9.22	-0.62	0.035363
DECR1	12.69	-0.79	0.042105	9.29	-0.66	0.015693
EIF2S1	11.42	1.73	0.016695	12.95	0.53	0.029109
ELN	10.94	1.36	0.013629	13.42	3.08	0.000016
ENO3	10.06	-2.23	0.001120	12.35	-0.69	0.009636
ENPP2	9.12	-1.91	0.004048	12.99	-0.41	0.016366
EPAS1	14.26	-2.59	0.000410	13.14	-0.64	0.014242
FAM154B	7.77	-1.06	0.033605	10.21	-0.36	0.035670
FAM20C	12.84	0.87	0.022157	10.69	1.44	0.003179
FSTL1	17.14	1.03	0.017730	15.16	1.96	0.000004

GGCX	10.73	-0.73	0.029469	10.70	-0.96	0.001969
GGT5	7.34	-0.67	0.044755	8.16	-0.93	0.001706
GINS1	12.36	1.10	0.013368	9.69	1.32	0.000611
GINS2	12.70	0.67	0.030172	8.98	1.71	0.000083
GPR20	9.21	2.02	0.000580	7.07	0.95	0.005075
GSTA4	12.11	-0.72	0.016022	11.55	-0.61	0.017292
HDAC6	10.63	1.53	0.000478	10.86	0.63	0.002000
HES6	11.29	1.53	0.016007	12.56	0.73	0.001583
HIP1R	12.29	-1.05	0.007774	9.86	-0.68	0.000640
HMGN3	12.82	0.69	0.048957	11.26	0.72	0.006134
INCENP	10.04	1.31	0.036223	12.30	1.14	0.000272
ING4	10.38	-1.08	0.008163	12.66	-0.41	0.021327
IQSEC2	11.60	-1.04	0.009299	12.44	-0.48	0.022345
KCNN2	12.06	-1.80	0.002929	8.47	-1.22	0.009402
KCTD14	7.07	-0.95	0.039884	9.80	-0.61	0.031442
KIT	9.66	-0.99	0.027587	13.12	-0.88	0.012905
LBH	10.31	1.56	0.002584	12.87	0.72	0.002351
LPCAT2	9.25	0.98	0.037453	7.60	0.90	0.008390
LRRFIP1	11.97	-0.66	0.037696	13.27	-0.54	0.007590
MAGI1	7.52	-1.21	0.024711	9.03	-0.51	0.049757
MAP3K11	13.29	-2.78	0.000346	11.58	-0.56	0.012199
MAP3K5	11.98	-1.80	0.006828	10.00	-0.87	0.006964
MBOAT1	9.75	1.31	0.000828	12.08	0.42	0.014647
MDGA1	9.91	1.90	0.007768	8.10	1.57	0.005156
MEGF6	9.82	-0.87	0.030507	12.14	-1.07	0.000602
NBL1	14.18	-0.93	0.043617	15.72	-0.47	0.022266
NCBP2	11.40	-1.97	0.000828	10.18	-0.45	0.014578
NEDD4L	10.41	-1.28	0.045937	9.60	-1.68	0.001422
NHLRC3	8.90	1.69	0.008096	8.34	0.95	0.000194
NIPAL3	13.11	-1.34	0.001092	13.13	-1.10	0.001203
NUBP1	13.19	0.79	0.038434	13.00	0.98	0.000249
NUSAP1	12.38	0.87	0.019359	9.80	1.60	0.001794
ODF3B	7.27	-0.90	0.025859	13.09	-0.69	0.015031
OTUD3	9.22	1.70	0.012549	11.10	0.72	0.009897
PMEPA1	10.80	0.86	0.013635	13.06	1.49	0.000062
PNKD	7.12	-1.15	0.005612	7.96	-1.08	0.003491
PNPLA6	9.56	-1.63	0.009919	12.37	-0.30	0.047030
POMGNT1	13.66	-0.88	0.005364	12.08	-0.32	0.023190
PPFIBP2	8.82	-0.75	0.032615	13.05	-0.80	0.015070
PPP2R3C	13.91	0.86	0.033926	11.45	0.53	0.025985
PRC1	14.41	0.84	0.004102	11.18	1.78	0.000124
PRELID2	9.33	0.99	0.042979	9.99	0.56	0.005315
PRICKLE1	11.41	-1.22	0.005224	14.07	-1.42	0.000180
PRMT2	10.05	-0.66	0.047910	14.01	-0.67	0.030405
PRPS2	8.02	-0.95	0.041219	10.22	-0.91	0.000555
R3HDM2	12.36	-1.23	0.019502	13.32	-0.42	0.017910

RALGAPB	10.47	-1.18	0.023239	12.96	-0.47	0.009014
RASGRP2	8.06	-1.37	0.009020	12.24	-0.60	0.004782
RBM24	9.47	-2.59	0.000360	9.44	-0.27	0.039708
REEP5	13.48	-2.17	0.002005	12.55	-0.42	0.025985
RGMB	9.81	-0.75	0.028634	11.30	-0.87	0.005668
RNASEH2A	13.07	0.75	0.036633	10.81	0.49	0.048594
RNF141	11.52	-1.54	0.015631	12.99	-0.67	0.001122
ROBO4	7.54	-1.65	0.011311	14.51	-0.67	0.011915
RRM2B	9.58	-2.97	0.001651	8.51	-0.62	0.006787
RTCD1	14.33	1.38	0.004627	12.19	0.52	0.007499
SELENBP1	12.64	-0.81	0.016828	17.28	-0.45	0.040980
SGIP1	8.80	-1.31	0.012026	8.65	-0.62	0.019749
SH3D19	12.72	-1.29	0.008996	9.60	-0.91	0.013287
SIRT5	10.40	-1.13	0.011311	11.21	-0.51	0.013278
SKA1	9.70	1.02	0.006580	8.56	1.79	0.000316
SLC2A6	11.76	0.89	0.014990	10.92	0.71	0.019866
SLC39A14	13.51	0.96	0.017472	11.15	2.02	0.000197
SLC40A1	8.90	1.32	0.021215	10.64	0.92	0.000270
SMARCC2	14.23	-0.64	0.032899	9.83	-0.54	0.018426
SMS	15.75	-1.76	0.017748	10.87	-0.87	0.000163
SMURF2	8.88	-1.23	0.013799	10.89	-0.83	0.000156
SOCS1	13.01	1.67	0.000297	10.87	0.60	0.009453
SORL1	9.72	-1.50	0.000718	11.34	-1.06	0.002206
SPC25	11.97	1.35	0.015518	11.39	2.26	0.000033
SPON2	15.60	-0.80	0.025019	12.53	-1.24	0.011622
SREBF2	11.51	1.25	0.001645	10.32	1.35	0.000207
STX3	8.69	-1.21	0.024221	8.72	-1.13	0.000179
SYNGR1	9.53	-1.37	0.008975	7.11	-0.46	0.043806
TCEAL1	11.86	-0.91	0.018668	10.23	-0.63	0.041974
TDG	13.68	0.99	0.033435	8.30	0.43	0.029690
TGFB3	8.06	1.00	0.010858	13.52	0.81	0.007305
TGFBR1	8.50	1.74	0.007822	12.40	0.56	0.005692
THBD	7.77	-1.61	0.012078	15.29	-1.22	0.034879
THBS3	10.56	-0.67	0.030059	13.75	-1.70	0.000072
TMEM159	12.32	-1.33	0.001835	12.14	-0.46	0.046713
TMEM164	11.32	-1.95	0.000495	13.69	-0.49	0.020506
TMEM20	7.65	0.85	0.027311	9.65	0.61	0.024024
TMEM45A	12.57	1.09	0.027911	11.66	1.14	0.002854
TRAIP	11.29	1.01	0.039309	8.71	1.42	0.005390
TRAK1	11.44	-1.45	0.032442	7.15	-0.33	0.034043
TSPAN13	7.88	-1.12	0.045464	15.27	-1.74	0.000216
TST	14.12	-2.01	0.000099	12.60	-0.86	0.001296
TTC39C	8.78	0.82	0.025257	10.00	1.44	0.017367
UBE2V1	13.50	2.19	0.000423	10.54	0.40	0.038237
WASF1	12.40	0.65	0.031618	8.51	0.41	0.049891

Implication de miR-199a-5p dans la fibrose pulmonaire idiopathique

Imène Sarah Henaoui¹, Christelle Cauffiez², Sébastien Aubert³, Matthieu Buscot^{1,4}, Edmone Dewaeles², Marie-Christine Copin³, Charles-Hugo Marquette⁴, Pascal Barbry¹, Michael Perrais⁵, Nicolas Pottier², Bernard Mari¹

¹UMR-7275 CNRS, université de Nice Sophia-Antipolis, institut de pharmacologie moléculaire et cellulaire, 660, route des Lucioles Sophia-Antipolis, 06560 Valbonne, Nice, France ;

²EA4483, faculté de médecine de Lille, pôle recherche, 1, place de Verdun, 59045 Lille, France ;

³Pôle de pathologie, CHRU de Lille, Lille, France ;

⁴Service de pneumologie, CHRU de Nice, Nice, France ;

⁵Inserm U837, centre Jean-Pierre Aubert, Lille, France.

nico_pottier@yahoo.fr

henaoui@ipmc.cnrs.fr



La fibrose pulmonaire idiopathique

Les pathologies fibroprolifératives représentent un problème majeur de santé publique et leur prévalence est en constante augmentation dans les pays industrialisés [1]. La fibrose pulmonaire idiopathique (FPI) est une forme fréquente et sévère de pneumopathie interstitielle idiopathique diffuse. Elle évolue souvent vers une insuffisance respiratoire progressive, et la médiane de survie est inférieure à cinq ans une fois le diagnostic établi [2]. La fibrose pulmonaire idiopathique est une pathologie chronique rare dont les causes demeurent mal connues, et qui ne bénéficie à ce jour d'aucun traitement efficace. Elle se caractérise histologiquement par un aspect de pneumopathie interstitielle commune, correspondant à une fibrose hétérogène et mutilante de l'interstitium pulmonaire avec des foyers de prolifération fibroblastique, des lésions en rayons de miel et de rares lésions inflammatoires (Figure 1). Le diagnostic repose sur l'analyse pluridisciplinaire des symptômes cliniques, la tomodensitométrie thoracique, l'absence de signes biologiques en faveur d'une maladie systémique et la biopsie pulmonaire vidéoendoscopique lorsqu'elle est indiquée. La fibrose correspond au dépôt excessif et persistant de tissu conjonctif cicatriciel en réponse à une lésion tissulaire chronique qui aboutit à la perte de fonction de l'organe atteint. Sur le plan physiopathologique, on considère actuellement qu'une agression répétée de l'épithélium alvéolaire serait responsable de la sécrétion par les pneumocytes de facteurs de croissance, tels

que le TGF β (*transforming growth factor β*), qui favoriseraient le recrutement, la prolifération et l'activation de fibroblastes pulmonaires ainsi que le dépôt excessif de matrice extracellulaire. Lors du processus de fibrose, les fibroblastes, organisés en foyers, acquièrent un phénotype de myofibroblastes. D'autres mécanismes pourraient également participer au processus de fibrose comme la transition épithélio-mésenchymateuse des cellules épithéliales, endothéliales ou mésothéliales, ainsi que le recrutement pulmonaire de fibrocytes circulants d'origine médullaire [2].

Les microARN : une nouvelle classe de régulateurs de l'expression génique

Les microARN (miARN) sont des petits ARN non codants d'environ 22 bases dont le rôle clé dans la régulation de nombreux processus cellulaires – survie, apoptose, prolifération, ou différenciation – a été récemment documenté [3]. Leurs mécanismes d'action

impliquent généralement la formation d'un complexe entre plusieurs bases situées dans la région 5' du miARN (séquence de reconnaissance ou *seed*) et l'ARNm cible (principalement dans sa partie 3' non codante [4].

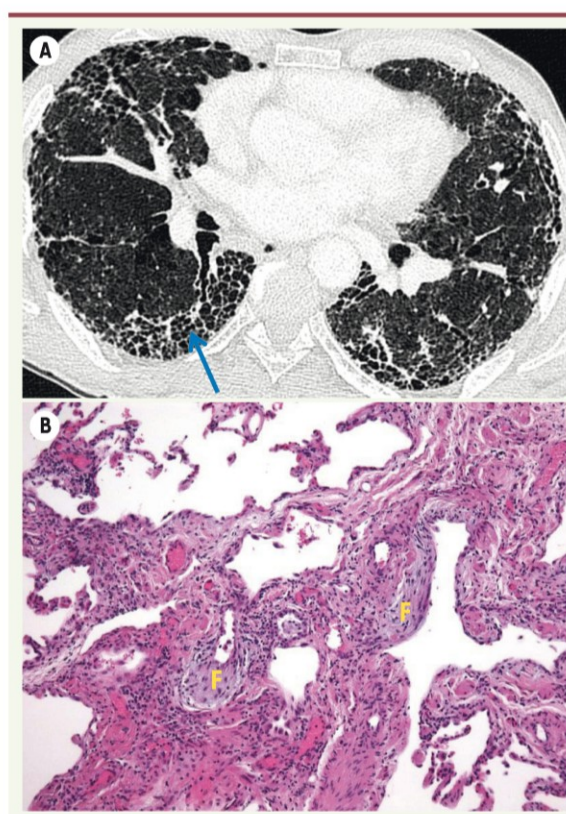


Figure 1. Aspects radiographiques et histologiques de la fibrose pulmonaire idiopathique. A. Tomodensitométrie thoracique montrant un aspect en rayon de miel typique de la fibrose pulmonaire idiopathique (flèche). B. Aspect histologique de fibrose pulmonaire idiopathique sur coupe de poumon colorée à l'hématoxyline/éosine. Observation à faible grossissement montrant notamment la présence de foyers fibroblastiques (F).

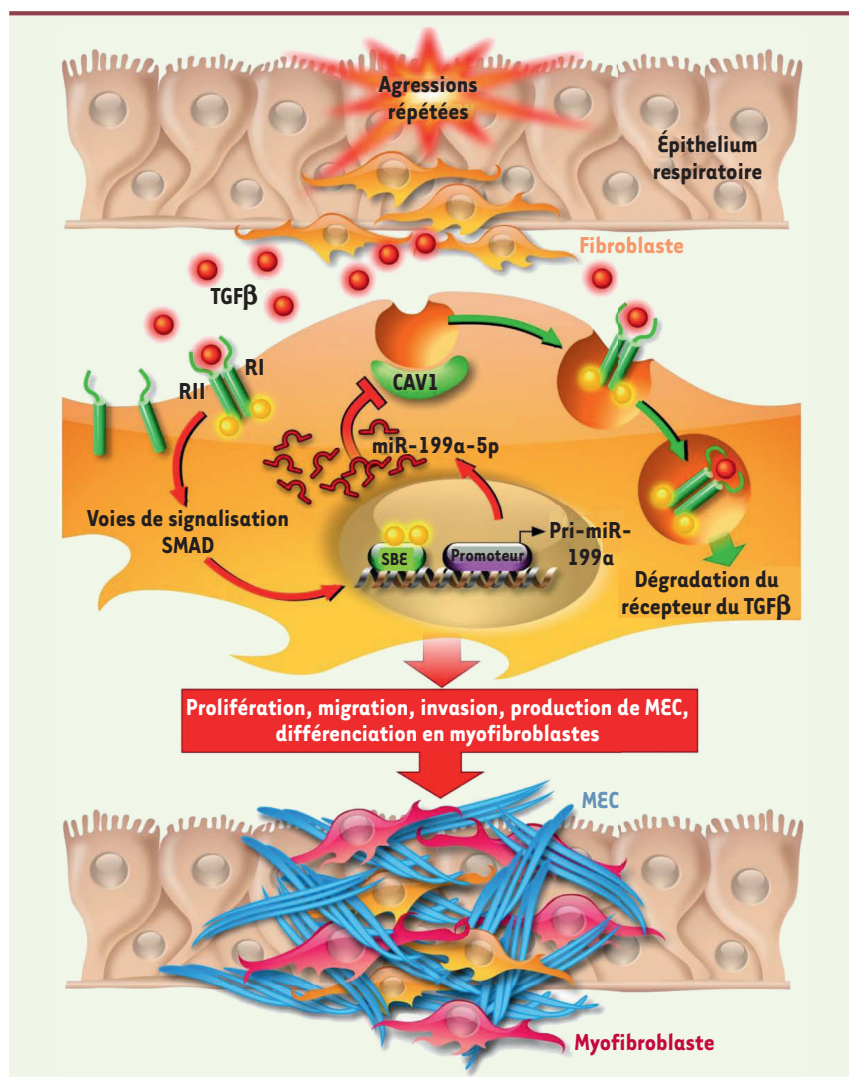


Figure 2. Modèle proposé pour la fonction de miR-199a-5p dans la fibrose pulmonaire. Les microlésions itératives de l'épithélium pulmonaire induisent un relargage de TGFβ qui se lie aux récepteurs TGFβR (RI et RII) au niveau des fibroblastes pulmonaires et induit l'expression de miR-199a-5p. Le complexe résultant sera internalisé selon deux voies distinctes d'endocytose. La voie dépendante de la clathrine (flèches rouges) est responsable d'une augmentation de la transduction du signal induite par le TGFβ, d'une activation des fibroblastes pulmonaires et de leur différenciation en myofibroblastes. La voie des radeaux lipidiques et des cavéoles (flèches vertes) (voie indépendante de la clathrine) induit quant à elle une dégradation du complexe TGFβ/TGFβR, inhibant de ce fait le processus de fibrose. La production de miR-199a-5p induit une régulation négative de la production de cavéoline-1 qui active alors la voie du TGFβ et génère des conséquences pathologiques. CAV1 : cavéoline-1 ; TGFβ : transforming growth factor-β ; TGFβR : transforming growth factor-β receptor ; SBE : SMAD binding element ; MEC : matrice extracellulaire (adapté de [7]).

La reconnaissance étant contrôlée par une courte séquence d'environ sept bases, chaque miARN a *de facto* la capacité de réguler un grand nombre de transcrits distincts. La maturation des miARN s'effectue tout d'abord dans le noyau, *via* les enzymes Drosha et Dicer. Les miARN sont ensuite

incorporés dans un complexe de *silencing* entraînant l'inhibition de la traduction et/ou de la dégradation des ARNm cibles [3]. Environ 2 000 miARN ont été caractérisés à ce jour chez l'homme et seraient potentiellement capables de réguler plus de 60 % de tous les transcrits.

miR-199a-5p : un « fibromiR » surexprimé dans la fibrose pulmonaire

Plusieurs miARN ont été impliqués dans les processus de fibrose tissulaire, mais ni leur(s) rôle(s) précis, ni leur(s) mécanisme(s) d'action n'ont été clairement définis [5]. Dans un travail publié récemment dans *Plos Genetics* [6], nous avons déterminé le profil d'expression pulmonaire des miARN dans un modèle expérimental murin de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine, couramment utilisé dans l'étude de la fibrose pulmonaire idiopathique. De manière intéressante, un microARN, miR-199a-5p, est surexprimé lors du processus de fibrose ; miR-199a-5p apparaissait comme le meilleur candidat car, d'un point de vue statistique, les variations de son expression étaient plus importantes dans les souches sensibles que dans les souches résistantes à la bléomycine. Sa surexpression a ensuite été confirmée dans des échantillons pulmonaires issus de patients atteints de fibrose pulmonaire idiopathique, mais aussi par hybridation *in situ* au sein des foyers fibroblastiques. Ces résultats évoquaient une implication possible de miR-199a-5p dans la physiopathologie de cette maladie, en particulier dans l'activation des fibroblastes pulmonaires et leur différenciation en myofibroblastes.

miR-199a-5p régule négativement l'expression de CAV1, essentielle à la réponse des fibroblastes pulmonaires au TGFβ

Les gènes cibles de miR-199a-5p ont ensuite été identifiés par l'étude du transcriptome des fibroblastes pulmonaires dans lesquels miR-199a-5p avait été surexprimé. Une diminution significative de l'expression du gène codant pour la cavéoline-1 (CAV1), un puissant inhibiteur du processus de fibrose pulmonaire, a été identifiée.



CAV1 est une protéine membranaire de 22 kDa essentielle à la formation des petites invaginations de la membrane plasmique, les *caveolae*. Les cavéoles représentent une catégorie de radeaux lipidiques particulièrement abondante dans les cellules différenciées comme les adipocytes, les cellules endothéliales, les pneumocytes de type I, les fibroblastes et les cellules musculaires lisses et striées. Dans le contexte d'un processus de fibrose pulmonaire, de nombreuses études ont montré l'implication des *caveolae* dans l'internalisation et la dégradation du complexe formé par le TGFβ et ses récepteurs. Il est en effet bien établi que l'activation des fibroblastes pulmonaires par le TGFβ induit une diminution de l'expression de CAV1 et une perte des signaux inhibiteurs exercés par les cavéoles sur la voie de signalisation du TGFβ [7].

Or, nos résultats montrent que l'exposition des fibroblastes pulmonaires au TGFβ induit la surexpression de miR-199a-5p ainsi qu'une diminution concomitante de l'expression de CAV1. Deux approches indépendantes basées sur l'utilisation d'oligonucléotides soit dirigés contre miR-199a-5p et permettant son inhibition, soit conçus pour bloquer spécifiquement

la fixation du miARN sur sa cible CAV1, ont permis de démontrer le rôle de miR-199a-5p dans la voie de signalisation du TGFβ. En effet, La transfection de ces deux types d'oligonucléotides dans les fibroblastes pulmonaires inhibe l'activation et la différenciation en myofibroblastes des fibroblastes traités par le TGFβ. L'ensemble de ces résultats suggèrent que miR-199a-5p participe à la régulation de CAV1 et représente un élément essentiel de la réponse des fibroblastes pulmonaires au TGFβ (Figure 2) [6].

Perspectives thérapeutiques

Notre étude révèle pour la première fois le rôle clé joué par le fibromiR miR-199a-5p dans le processus de fibrose pulmonaire. En particulier, ce miARN apparaît comme un régulateur essentiel de la signalisation du TGFβ, notamment par ses effets sur le gène codant pour la cavéoline-1. Ces résultats pourraient susciter de nouvelles stratégies thérapeutiques dans le cadre des pathologies fibroprolifératives basées sur la modulation de l'expression des miARN à l'aide d'oligonucléotides de synthèse. Une telle approche a déjà été utilisée avec des résultats significatifs dans le

traitement de l'hépatite C [8]. Ainsi, le développement de molécules dirigées contre les fibromiR pourrait permettre à terme de stopper la progression de la fibrose, voire de la faire régresser. ♦

miR-199a-5p in idiopathic pulmonary fibrosis

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. Wynn TA. Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. *J Clin Invest* 2007 ; 117 : 524-9.
2. Wilson MS, Wynn TA. Pulmonary fibrosis: pathogenesis, etiology and regulation. *Mucosal Immunol* 2009 ; 2 : 103-21.
3. Hartmann C, Corre-Menguy F, Boualem A, et al. Les microARN. *Med Sci (Paris)* 2004 ; 20 : 894-8.
4. Brennecke J, Stark A, Russell RB, et al. Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol* 2005 ; 3 : e85.
5. Pandit KV, Milosevic J, Kaminski N. MicroRNAs in idiopathic pulmonary fibrosis. *Transl Res* 2011 ; 157 : 191-9.
6. Lino Cardenas CL, Henaoui IS, Courcot E, et al. miR-199a-5p is upregulated during fibrogenic response to tissue injury and mediates TGFbeta-induced lung fibroblast activation. *PLoS Genet* 2013 ; 9 : e1003291.
7. Wang XM, Zhang Y, Kim HP, et al. Caveolin-1: a critical regulator of lung fibrosis in idiopathic pulmonary fibrosis. *J Exp Med* 2006 ; 203 : 2895-906.
8. Lanford RE, Hildebrandt-Eriksen ES, Petri A, et al. Therapeutic silencing of microRNA-122 in primates with chronic hepatitis C virus infection. *Science* 2010 ; 327 : 198-201.

NOUVELLE

La métabolomique au service de la médecine

L'exemple du carcinome rénal

Valérien Dormoy^{1,2}, Thierry Massfelder¹

Un nouveau membre de la famille

« -omique »

La métabolomique, qui représente une discipline nouvelle au sein de la grande famille « -omique », comporte de nouveaux outils à fort potentiel et suscite un vif intérêt dans la communauté scientifique, alors que les contraintes techniques semblaient infranchissables il y a seulement quelques années [1, 2].

Que se cache-t-il derrière ce terme de métabolomique, élevé récemment au rang de science (Figure 1) ? Un métabolite est une substance de petite taille (en général moins d'un kilodalton) formée au cours du métabolisme, qu'il s'agisse du produit final ou d'un intermédiaire. La principale limitation à l'identification des métabolites se situe dans l'usage des techniques de détection. Il est clas-

¹Inserm U1113, équipe 3

« signalisation et communication cellulaires dans les cancers du rein et de la prostate », université de Strasbourg, faculté de médecine, 11, rue Humann, 67085 Strasbourg, France ;

²Département de biologie développementale et cellulaire, université de Californie, Irvine, 4150 McLaugh Hall, 92697 Irvine, CA, États-Unis.

valerian.dormoy@unistra.fr

massfeld@unistra.fr

sique de classer ces métabolites en deux catégories en fonction de leur origine : endogènes lorsqu'ils sont produits par l'organisme, exogènes lorsqu'ils proviennent de l'environnement extérieur. La métabolomique, en tant que technique, apparaît au tout début du

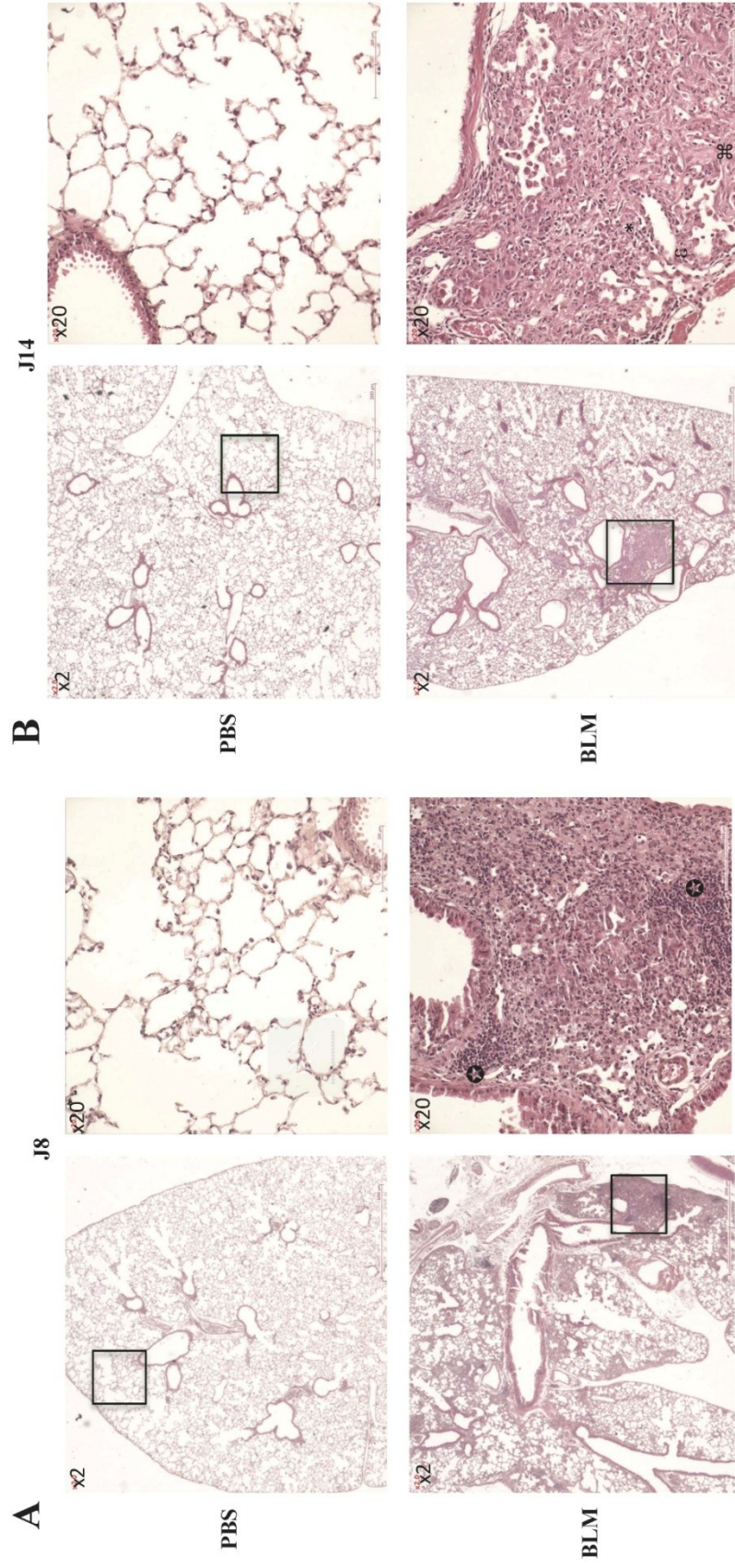


Figure 26: Aspect histologique des lésions pulmonaires induites par la bléomycine. Coupes de poumons réalisées après instillation de 0,750U de bléomycine ou de PBS observées au microscope optique après coloration par l'hématoxyline-éosine à grossissement x2 et x20. (A) L'aspect à J8 montre un aspect inflammatoire aspécifique avec un infiltrat riche en cellules mononucléées (*). (B) A J14 l'aspect lésionnel est en faveur d'une fibrose jeune hétérogène avec des dépôts excessifs de matrice extra-cellulaire(), une hyperplasie épithéliale (ε) et quelques foyers fibroblastiques(*). L'instillation de PBS n'induit pas de modification histologique.**

RESULTATS NON PUBLIES

I) Potentiel thérapeutique du LNA-anti-miR-199a-5p dans le modèle de fibrose pulmonaire induite par bléomycine

Dans le cadre du « master 2 recherche » de Mr. Matthieu Buscot, que j'ai supervisé, nous avons évalué le potentiel thérapeutique de miR-199a-5p dans le modèle de fibrose induite par la bléomycine. Lors de cette étude, nous avons constaté que l'administration de l'inhibiteur de miR-199a-5p après instillation bléomycine chez la souris, induisait un **rétablissement du niveau d'expression de CAV1** et contribuait à la **diminution de** marqueurs profibrotiques. Cette étude préclinique prometteuse, suscite **un réel intérêt thérapeutique pour l'inhibiteur de miR-199a-5p** dans le traitement de la fibrose pulmonaire idiopathique et d'autres maladies fibroprolifératives.

1) Mise au point du modèle expérimental *in vivo*

(a) L'instillation intratrachéale de bléomycine induit des lésions pulmonaires comparables à celles d'une FPI

Dans une première expérience, nous avons validé le modèle expérimental de fibrose pulmonaire induite à la bléomycine. Les souris C57bl/6 traitées par instillation intra-trachéale de bléomycine (0,750U) développent des lésions pulmonaires histologiques compatibles avec une UIP, un profil anatomo-pathologique distinctif de la FPI chez l'homme. Sur les coupes histologiques réalisées au 8ème jour (**Figure 26A**), il existe des signes d'inflammation aspécifique : un infiltrat de cellules mononuclées, le collapsus des espaces alvéolaires, et un début d'organisation fibreuse avec dépôts de matrice extracellulaire. Ce motif histologique est compatible avec des lésions de Dommage Alvéolaire Diffus (DAD) (2002), qui concorde avec la détresse respiratoire et la mortalité élevée (environ 50%) constatée dans les suites immédiates de l'instillation. Passé le « cap » du 8ème jour, la mortalité baisse drastiquement. Au 14ème jour (**Figure 26B**), l'aspect lésionnel est compatible avec des lésions de fibrose jeune hétérogène : des dépôts de matrice extracellulaire, une hyperplasie épithéliale et surtout des foyers fibroblastiques qui sont caractéristiques d'une UIP.

(b) La réduction de la dose de bléomycine ne permet pas de réduire la mortalité précoce et semble induire une fibrose moins efficacement. L'administration du LNA par voie intra-péritonéale est bien tolérée.

Afin d'optimiser notre modèle en réduisant la mortalité induite par l'instillation, nous avons cherché à savoir si la diminution de la dose de bléomycine de moitié permettait d'épargner des décès avec une efficacité comparable. De plus, la tolérance des inhibiteurs par voie

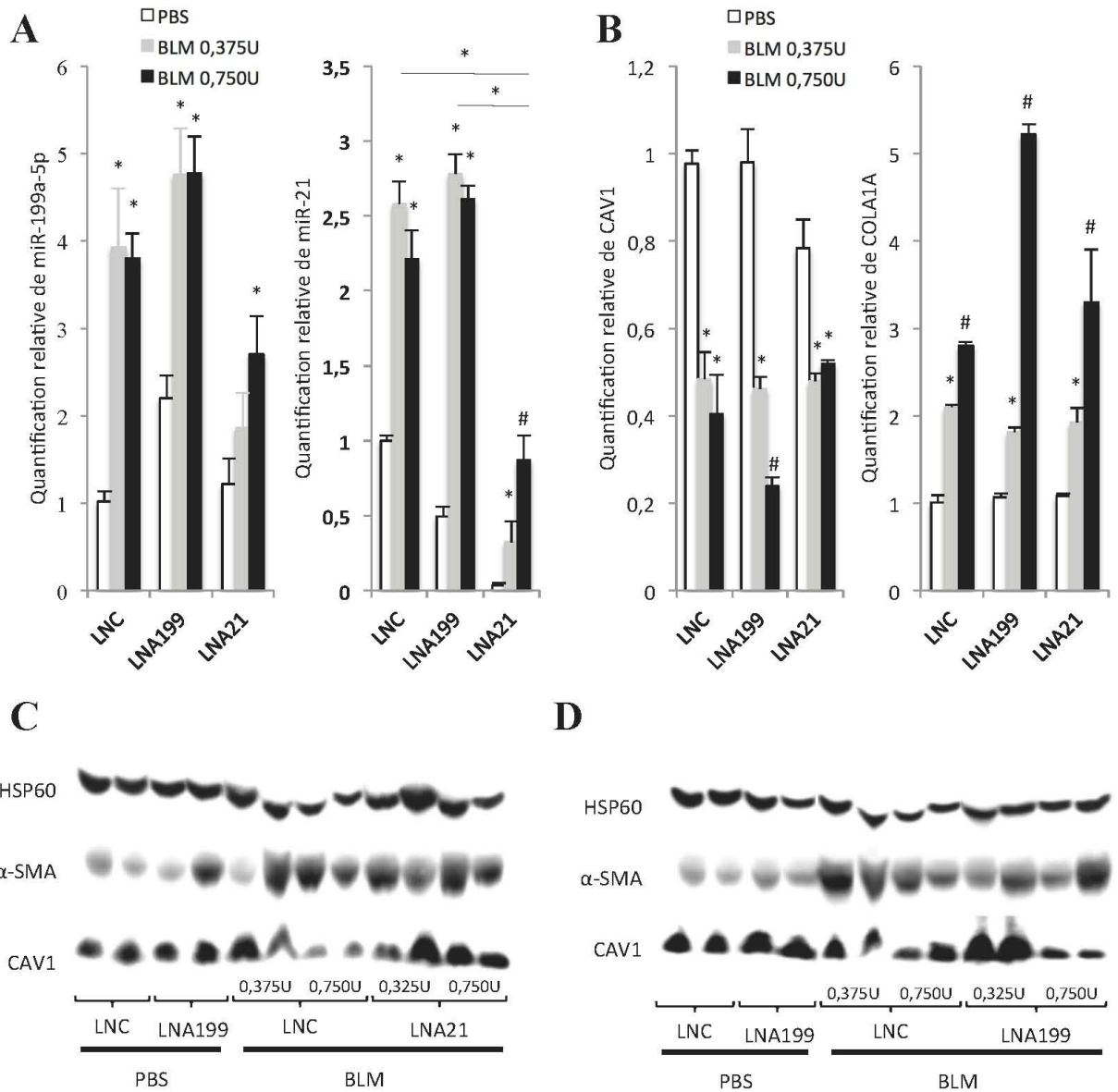


Figure 27: Mise au point de l'induction de la fibrose par instillation intra-trachéale de bléomycine. Instillation intra-trachéale de 0,375 ou 0,750U de bléomycine (BLM) ou de PBS dans. Les souris reçoivent ensuite une injection hebdomadaire de LNC, de LNA21 ou de LNA199 à 10mg/kg. Les souris sont sacrifiées à J14. **(A) Expressions pulmonaires relatives de de miR199a-5p et de miR-21** en RT-qPCR (n=2). SNO202 est utilisé en tant que normalisateur endogène. **(B) Expression pulmonaire relative de CAV1 et de COL1A1** en RT-qPCR (n=2). PPIA est utilisé en tant que normalisateur endogène. Les résultat sont exprimé en moyenne de l'expression relative \pm SEM. * $p < 0,05$ par rapport au groupe PBS; # $p < 0,05$ par rapport au groupe BLM 0,375. **(C) Expression** protéique en Western Blot de CAV1 et d' α -SMA chez les souris traité au LNA 199 et au **(D) LNA-21**. HSP60 est utilisé en tant que normalisateur. (* $p < 0,05$).

systémique a été évaluée. L'**Annexe 1** montre une mortalité identique dans les bras traités avec 0,750U et 0,375U de bléomycine. Les mortalités sont identiques quel que soit le LNA administré. Comme attendu, les **miR-199a-5p et miR-21 sont induits de façon significative dans les groupes traités à la bléomycine**, et à des niveaux comparables quelle que soit la dose administrée (**Figure 27A**). Le LNA199 ne semble pas affecter les niveaux de miR-199a-5p détectés en RTqPCR. Par contre, dans les groupes traités par le LNA21, les niveaux de détection de miR-21 sont significativement plus faibles que dans les autres.

Les niveaux de CAV1 sont diminués de façon significative dans tous les groupes bléomycine par rapport aux groupes contrôle aussi bien au niveau du transcrit (**Figure 27B**) que de la protéine (**Figures 27C et D**). Les PCR quantitatives montrent un effet-dose dépendant de la bléomycine sur l'expression de CAV1 dans les groupes LNC ($p=0,05$) et LNA199 ($p=0,003$). **L'induction du collagène Ia (COL1A1), un marqueur de fibrose, mesurée par qPCR apparaît également dose-dépendante** chez les souris recevant la bléomycine (**Figure 27B**). Aucun inhibiteur de type LNA ne semble diminuer les niveaux de collagène Ia. L' α -SMA, un marqueur du myofibroblaste, a été évaluée par Western Blot, et est également induite (**Figures 27B et C**) par le traitement à la bléomycine.

(c) Réplication des résultats

Le protocole précédent a été ensuite répliqué avec un seul bras bléomycine à la dose optimale (0,750U) et avec des effectifs doubles dans les groupes traités par inhibiteurs (**Annexe 2**). Une mortalité plus élevée a été observée dans le groupe bléomycine comparé au groupe solution saline (25% versus 32%). Aucune différence significative de poids ou de mortalité n'a été mesurée entre les groupes recevant les LNA ou le contrôle. L'effet des LNA sur la détection des miARN a été premièrement analysé en qPCR. **Aucun effet significatif du LNA199 n'est observé alors que le LNA21 abolit spécifiquement le signal mesuré pour miR21 (Figure 28A)**. Ces résultats ont été confirmés par les Northern Blot (**Figure 28B**) : là encore, l'administration de LNA21 éteint spécifiquement le signal correspondant à miR-21, alors que le LNA199 ne semble pas avoir d'effet significatif sur les niveaux de miR-199a-5p mature. Une baisse globale et hétérogène de CAV1 est constatée dans les poumons des souris exposées à la bléomycine, aussi bien au niveau des transcrits (**Figure 28C**) que des protéines (**Figure 28D**). Le traitement par LNA199, semble éviter la diminution des transcrits de CAV1 (**Figure 28C**). Cette tendance n'est par contre pas retrouvée au niveau protéique (**Figure 28D**). De manière inattendue, le LNA21 semble prévenir la baisse de CAV1 en transcrit et en protéine. Les marqueurs de fibroses (Fibronectine et Collagène Ia) sont induits de façon

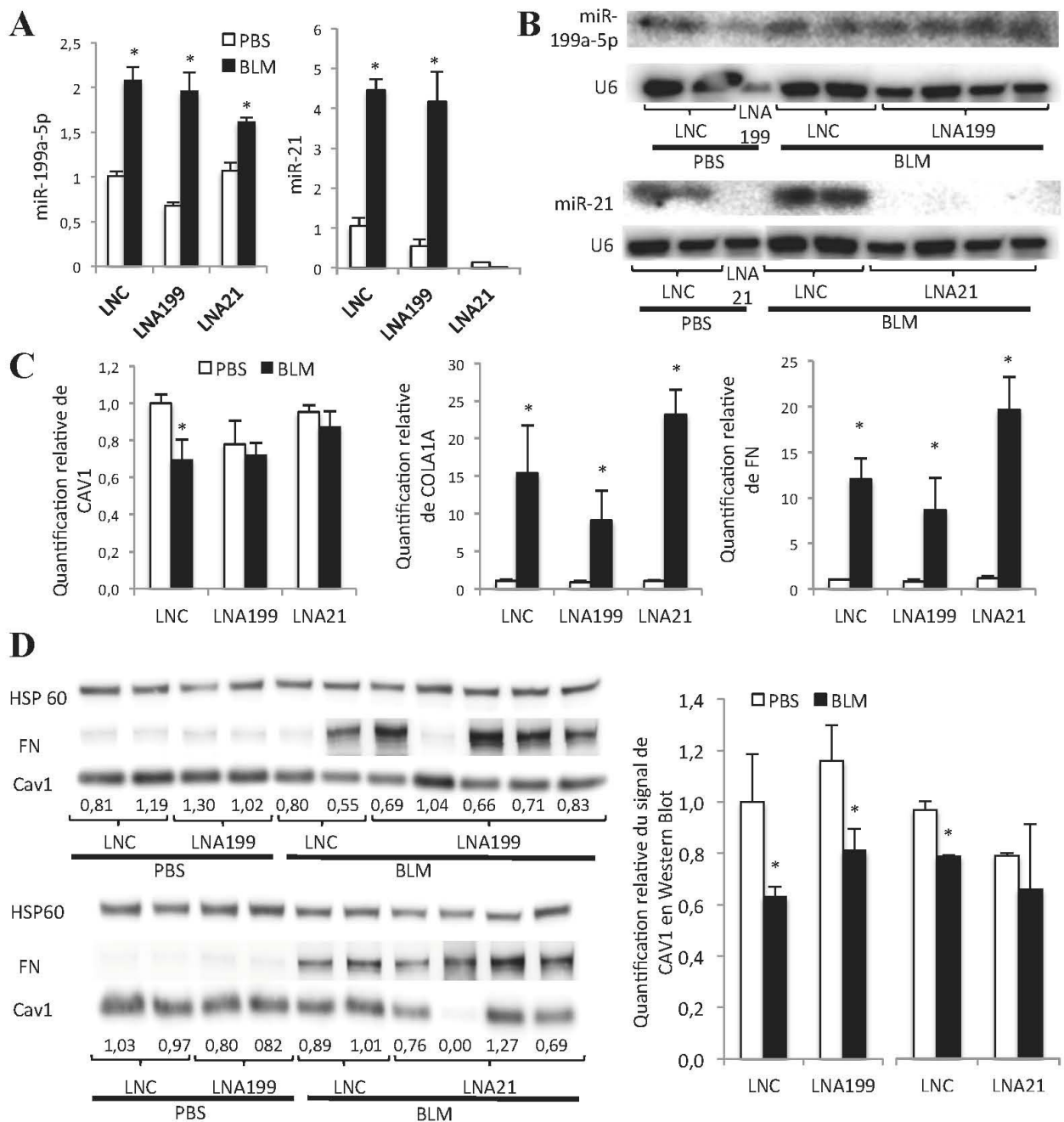


Figure 28: Réplication de la première expérience. Instillation intra-trachéale de bléomycine à la dose de 0,750U ou de PBS. Les souris reçoivent ensuite une injection hebdomadaire de LNC, de LNA21 ou de LNA199 à 10mg/kg. (A) Quantifications relatives par RT-qPCR de miR-199a-5p exprimées en moyenne des RQ \pm SEM. SNO202 est utilisé comme normalisateur (n=2-5). (B) Analyse de l'expression de miR-199a-5p et de miR-21 par Northern blot. U6 est le normalisateur endogène. (C) Quantifications relatives par RT-qPCR des marqueurs de fibrose (FN et COLA1A) et de CAV1 exprimés en moyenne des RQ \pm SEM. PPIA est utilisé comme normalisateur (n=2-5). (D) Western blot pour la cavéoline 1 (CAV1) et la fibronectine (FN) ; Quantification relative du signal par rapport à HSP60 aux conditions PBS-LNC. (*p<0,05)

significative par la bléomycine aussi bien au niveau transcriptionnel (**Figure 28C**) que protéique (**Figure 28D**), et cela de façon également hétérogène. L'administration de LNA199 ou LNA21 ne semble pas empêcher significativement cette augmentation. **Il existe cependant une tendance à la diminution de FN et de COLA1A lors de l'analyse en qPCR dans les poumons des souris traitées par le LNA199 comparé à ceux traités par le contrôle (LNC).**

2) Intensification du traitement par le LNA-miR-199a-5p

L'absence d'effet de LNA199 sur miR-199-5p comparé à celui de LNA21 sur la détection des ces miR matures respectifs par qPCR ou Northern Blot, nous a fait évoquer deux principales hypothèses. Premièrement, un problème d'ordre pharmacocinétique, c'est à dire que le LNA199 serait dégradé prématurément avant qu'il n'ait pu atteindre sa cible. Deuxièmement, le LNA199 serait effectivement capable d'atteindre les fibroblastes pulmonaires mais son affinité ne serait pas suffisante pour se fixer au miR-199a-5p et entraîner son inhibition. Pour tester cette deuxième hypothèse, **nous avons décidé d'augmenter significativement la dose de LNA199 afin de contourner un problème d'affinité.** Les souris ont ainsi reçu une posologie double (20mg/kg) à raison de 3 injections hebdomadaires (**Annexe 3**). **Les fortes posologies de LNA199 ont été bien tolérées.** Dans le bras solution saline, la mortalité et la prise de poids sont comparables entre le groupe LNC et LNA199 (**Figure 29A**). Dans le bras bléomycine, la mortalité est également identique entre les souris traitées et celles recevant le contrôle (**Annexe 3**). De manière intéressante, le LNA199 à forte dose semble prévenir la perte de poids, sans que cette différence ne soit significative. L'analyse par qPCR, montre une **baisse significative de l'induction de miR-199a-5p dans les poumons de souris du bras bléomycine traitées par le LNA199 (Figure 29B).** Le LNA199 à forte dose semble capable d'empêcher la diminution de CAV1 dans les poumons de souris exposées à la bléomycine. Sur l'analyse par Western Blot (**Figure 29D**) dans le bras bléomycine, le groupe LNA199 montre un niveau de CAV1 identique voire même supérieur à celui du groupe contrôle, à l'exception d'un échantillon. La baisse de l'expression de CAV1 n'est plus significative dans le groupe traité par LNA199 comparée à la baisse dans le groupe LNC. Dans le bras bléomycine, **l'expression protéique de fibronectine est diminuée de façon significative dans le groupe LNA199** par rapport au groupe témoin (**Figure 29D**). En qPCR, le niveau de collagène Ia, bien que plus faible, n'est, par contre, pas diminué de façon significative (**Figure 29C**).

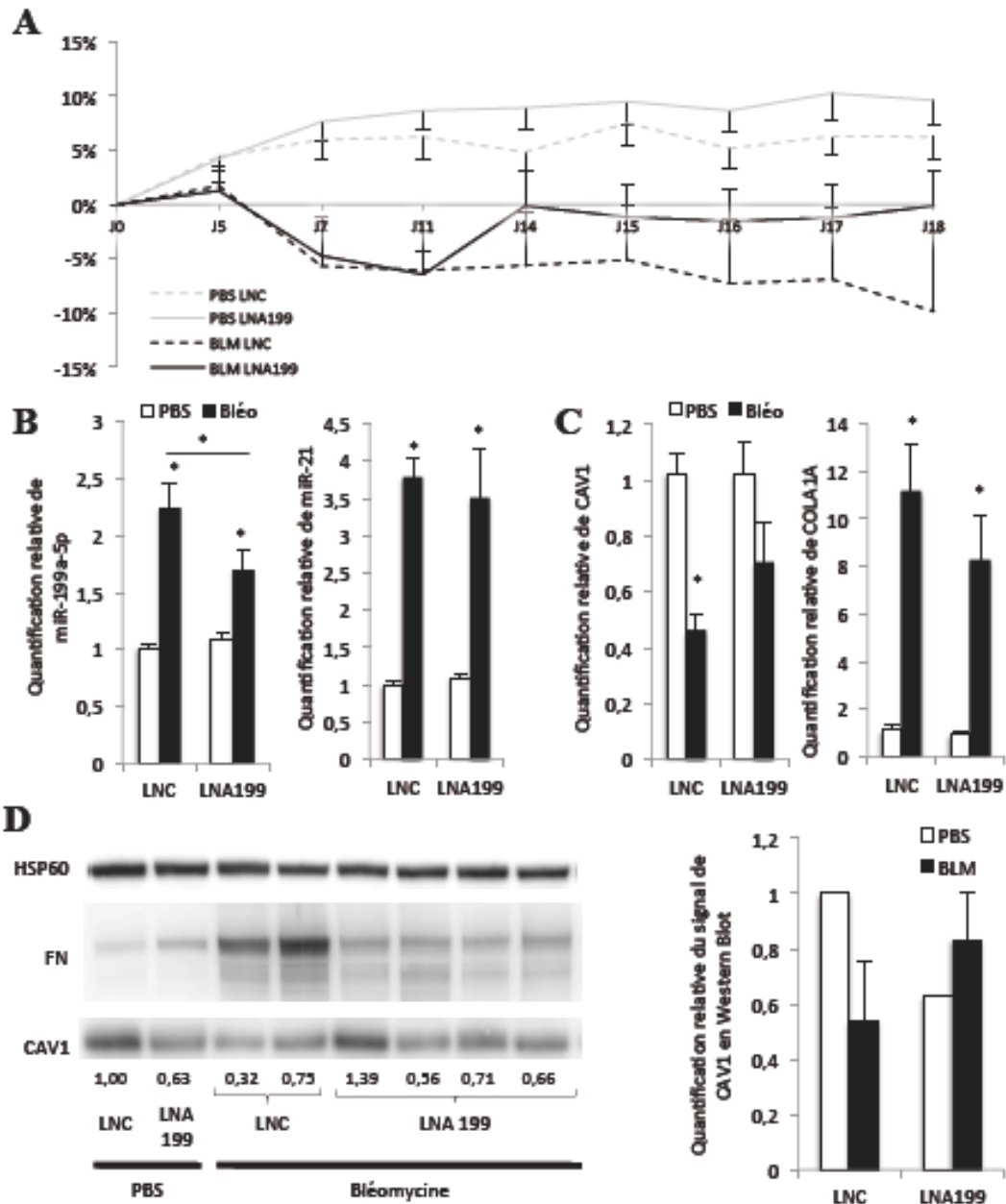


Figure 29: Intensification du traitement par le LNA-anti-miR-199a-5p : Instillation intra-trachéale de bléomycine à la dose de 0,750U ou de PBS. Les souris reçoivent ensuite trois injection hebdomadaire de LNA199 ou de LNC à 20mg/kg. Le sacrifice a lieu à J18. (A) Évolution pondérale (en % du poids de départ) (B) Expression relative de miR-199a-5p et de miR-21 par RT-PCR. Résultats exprimés en RQ \pm SEM. SNO202 est utilisé comme normalisateur (n=5). (C) Expression relative du collagène Ia1 (COLA1A) et de la cavéoline 1 (CAV1) par RT-PCR exprimées en moyenne des RQ \pm SEM. PPIA est utilisé comme normalisateur (n=5). (D) Analyse de l'expression protéique de CAV1 et de FN par Western Blot après traitement par le LNA-199. Quantification relative du signal de CAV1 par rapport à HSP60 et à la condition témoin PBS-LNC. (* p<0,05).

MATERIELS ET METHODES

3) Inhibiteurs de miARN

L'anti-miR-199a-5p de type LNA (LNA-199) utilisé *in vitro* est un 15-mer décrit et validé précédemment. Pour l'utilisation *In vivo*, un anti-miR-199a-5p plus courts (12-mers) a été conçu et produit par la société Exiqon® (miRCURY LNA™). Le contrôle négatif (LNC) était également produit par Exiqon® (microRNA Inhibitor Negative Control A). Les séquences des LNA sont (5'-3') :

- LNA-199: AGTCTGAACACTGGG
- LNA-199 *in vivo*: TCTGAACACTGG
- LNA-21 : TCAGTATTAGCAGCT
- LNC : GTGTAACACGTCTATACGCCCA

4) Expérimentation *In vivo*

Les souris C57Bl/6 (Charles River©) sont traitées à l'âge de 6 semaines ce qui correspond à un poids minimum de 20 grammes. L'anesthésie est réalisée par voie intra-péritonéale par xylazine (ROMPUN 2 % Bayer Animal Health™) et kétamine (KETAMINE 1000 Virbac™) aux doses de 100mg/kg et 10mg/kg respectivement. L'anesthésie peut être antagonisée par l'atipémazole (ATIMPAM® EUROVET Animal Health™) 1mg/kg. L'intubation trachéale est réalisée à l'aveugle. Le bon positionnement de la canule d'instillation est contrôlé par exposition trachéale après incision sous mandibulaire et dissection des tissus sous cutanés. 50µl de solution saline taponnée au phosphate (PBS) ou de bléomycine (BLM) sont instillés dans la trachée à mi-hauteur à l'aide d'un MicroSprayer® AEROLYSER® (Pen Century™). La dose de bléomycine (Sigma-Aldrich®) est fixée à 0,750U. Après la procédure l'incision est suturée au fil non résorbable (Filapeau® 6/0 Peters Surgicals™). Les LNAs sont administrés par voie intra-péritonéale aux doses de 10mg/kg ou 20mg/kg et dilués dans du PBS. Les injections se font à J4 et J8 ou de façon trihebdomadaire. Chaque injection est précédée d'une pesée. Le sacrifice est réalisé à J14 ou J18 par dislocation cervicale après anesthésie. Tout le personnel et les collaborateurs ont mené leurs activités dans le respect de la Charte Nationale portant sur l'éthique de l'expérimentation animale, après soumission du projet d'expérimentation animale à l'avis du CIEPAL-azur.

Analyse histologique : Les poumons sont fixés dans une solution à 10% de formol puis inclus en paraffine. Des coupes 5µ sont réalisées et les lames sont colorées par l'Hématoxyline et l'Éosine puis observées au microscope optique (grossissement X2 et X20).

5) Analyse protéique

Les tissus sont dissociés de façon mécanique par le gentleMACS™ Dissociator (Miltenyibiotec™). Les lysats tissulaires (ou les cultures cellulaires) sont re-suspendus dans du tampon de lyse RIPA™ contenant des inhibiteurs de protéase et de phosphatase (Sigma®). Après sonication et centrifugation, les protéines sont dosées grâce au kit Pierce™ BCA Protein Assay selon les recommandations du fabricant. La séparation des protéines des échantillons se fait par électrophorèse sur gel en conditions dénaturantes (Novex® Gels BOLT™).

(a) Les anticorps primaires:

Anticorps	Références	Hôte	Dilution
Anti α -SMA monoclonal	SIGMA- ALRICHT® WH0000059M2	Souris	1/1000
Anti CAV1 polyclonal	Santa Cruz Biotech® SC-894	Lapin	1/2000
Anti FN polyclonal	SIGMA- ALRICHT® F3648	Lapin	1/4000
Anti HSP60 polyclonal	Santa Cruz Biotech® SC-1722	Chèvre	1/2000

L'hybridation secondaire est faite avec l'anticorps polyclonal idoïne conjugué à l'HRP (Dako® P 0448, P0447, P0449). Après révélation par le kit Novex® ECL Chemiluminescent

Substrate Reagent, la lecture est effectuée avec le Fujifilm® LAS-3000 Imager. La quantification est faite en utilisant le logiciel ImageJ version 1.47s (National Institute of Health, USA). La protéine HSP60 sert de normalisateur endogène.

6) Analyse des ARNs

Les tissus sont dissociés de façon mécanique par le gentleMACS™ Dissociator (Miltenyibiotec™). Les lysats tissulaires sont re-suspendus dans du tampon de lyse QIAzol (Qiagen®). Le kit miRNeasy Mini (Qiagen®) sert pour l'extraction des ARNs totaux. Les étapes de retro-transcriptions des ARN sont réalisées avec les kits High-Capacity cDNA Reverse Transcription et MicroRNA Reverse Transcription (Applied Biosystems® TaqMan®) en utilisant les sondes appropriées et selon les recommandations du fabricant. La

quantification des différents gènes ou des miARN est faite en duplicata par méthode TaqMan® (Applied Biosystems™) avec le kit TaqMan® Universal Master Mix II selon le protocole du fabricant. La réaction d'amplification est réalisée sur LightCycler® 480 Instrument.

La quantification est mesurée en Ct (Cycle threshold) correspondant au nombre de cycles nécessaires à l'obtention d'un signal mesurable. Pour les qPCR, la quantification relative (RQ) réalisée selon la technique des $\Delta\Delta Ct$ ($RQ=2^{-\Delta\Delta Ct}$). ΔCt représente la différence avec le normalisateur endogène (PPIA pour les gènes et SNO202 pour les miR). $\Delta\Delta Ct$ correspond à la normalisation par rapport à la condition témoin (Souris du groupe PBS traitées par le LNC).

7) Northern Blot

La migration est réalisée en conditions dénaturante sur gel urée (Novex® TBE-Urea Gels). Le transfert se fait sur membrane nylon (GE Health Care Life Science®Amersham Hybond-N+). Après « crosslinking » par rayonnement UV, les miARN d'intérêt sont révélés par hybridation de la membrane à l'aide de sondes ADN (IDT®) spécifiques préalablement marquées au 32P de séquences (5'-3') :

miR-199a-5p : GAACAGGTAGTCTGAACACTGGG

miR-21 : TCAACATCAGTCTGATAAGCTA

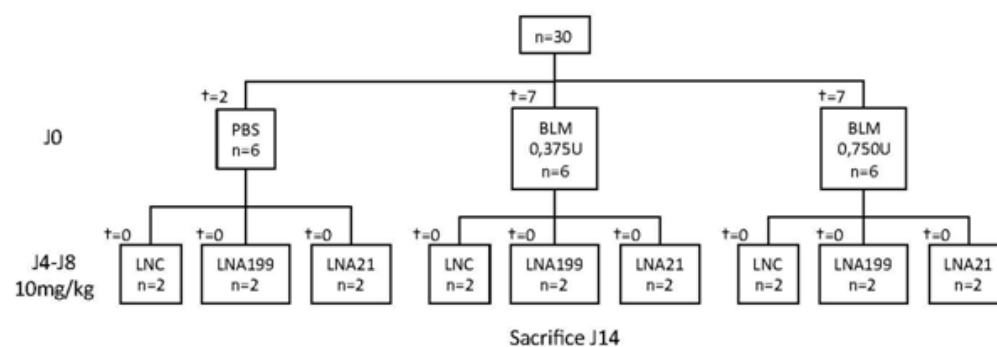
La radioactivité associée à la membrane était mesurée sur le FujiFilm® FLA-5100 Fluorescent Image Analyzer™.

8) Calculs et analyse statistique

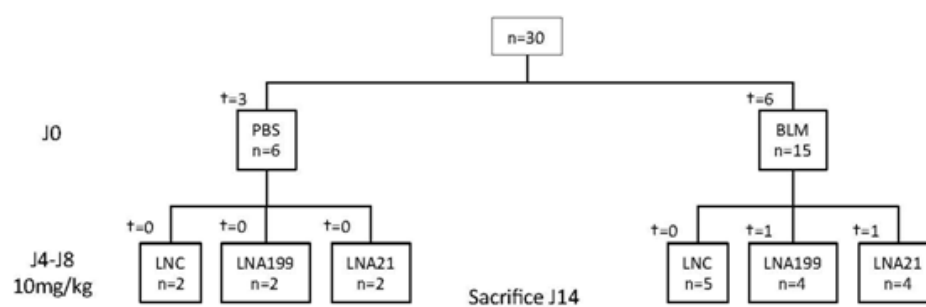
La dispersion des valeurs est calculée par l'erreur standard ou SEM (Standard Error of the Mean) selon la formule (σ =écart type, n =nombre d'échantillons) : $SEM = \sigma / \sqrt{n}$

La comparaison des moyennes est faite à l'aide d'un test t de Student bilatéral. Le seuil de significativité retenu est de $p \leq 0,05$.

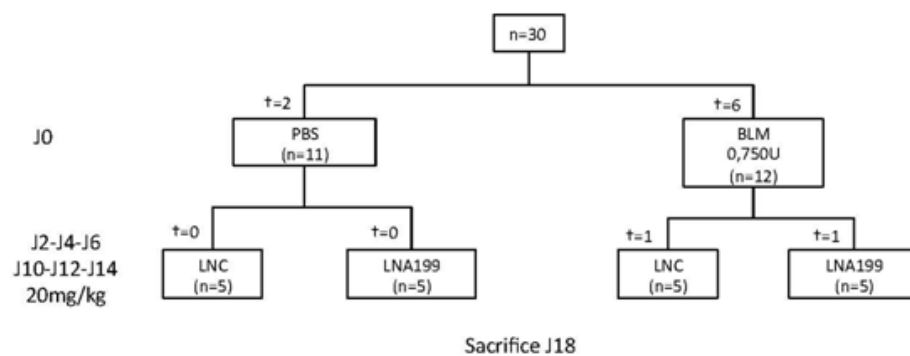
II) ANNEXES



Annexe 1: Diagramme de flux montrant la répartition des effectifs et de la mortalité (\dagger) de la première expérience *in vivo*.



Annexe 2: Diagramme de flux montrant la répartition des effectifs et de la mortalité (\dagger) de la deuxième expérience *in vivo*.



Annexe 3: Diagramme de flux montrant la répartition des effectifs et de la mortalité (\dagger) de la troisième expérience *in vivo*.

III)DISCUSSION

Ce travail de thèse a permis de mettre en évidence le rôle pro-fibrotique de miR-199a-5p dans la fibrose pulmonaire. De plus, nous avons montré son implication dans la fibrose rénale et hépatique, ce qui élargit son intérêt comme cible thérapeutique potentielle à d'autres maladies fibroprolifératives. Dans les paragraphes suivants, je discuterai des principaux résultats obtenus et des perspectives ouvertes par ces travaux.

A) Matériel:

Primers:

Reverse : CTGCGCGACGGAGCAGGATCTC

Forward1: CTGCAGATCTCTAGGAAGGCCACATGTGGA

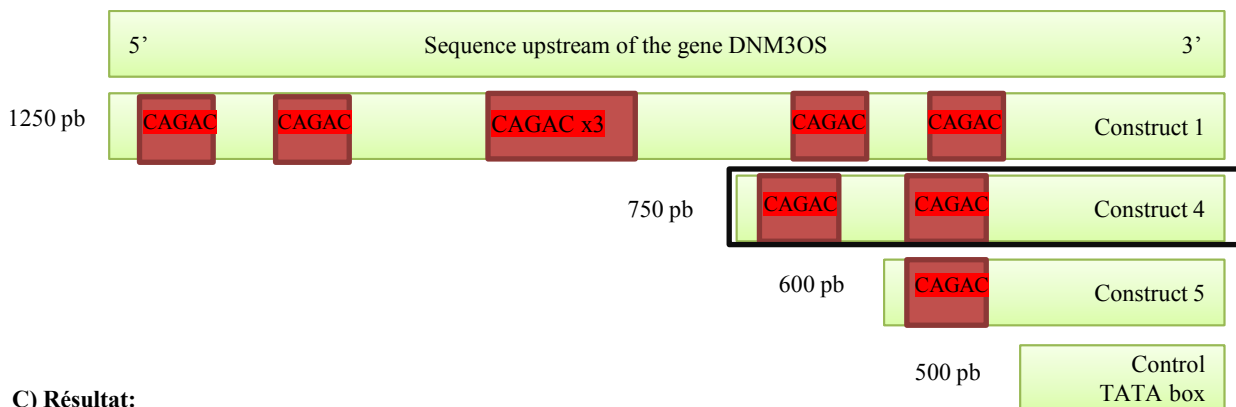
Forward4: CTGCAGATCTTTCATCTACCCTCTATCTTCAAATTAC

Forward5: CTGCAGATCTCGTTACACTAAACATCTGGTACCA

Forward control: CTGCAGATCTATACCCAAACCTCCCCAGG

enzymes de restriction: SacI XhoI. plasmide: PGL3 basic.

B) Constructions validées:



C) Résultat:

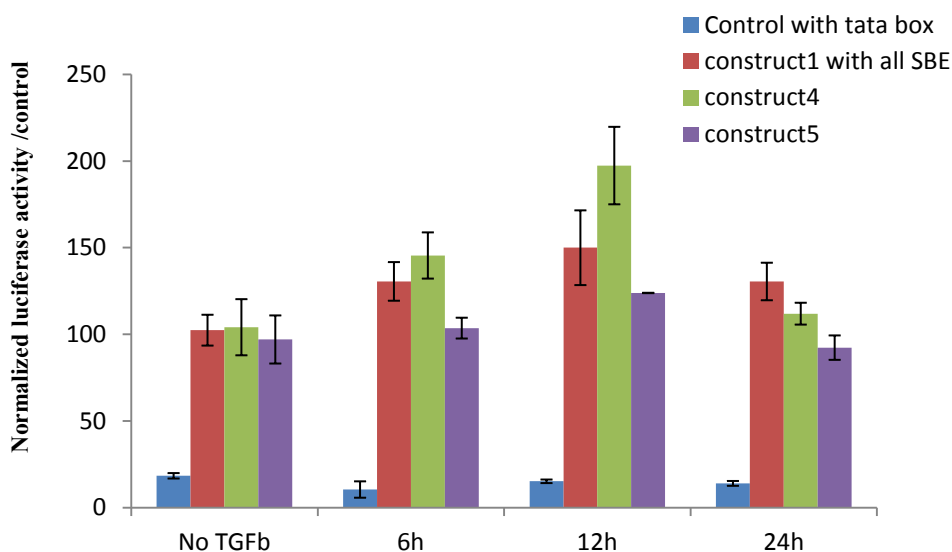


Figure 30: Analyse de l'activation du promoteur du gène DNMT3OS par le TGF-β. (A) les constructions (1,4, 5 et le contrôle tata box) ont été amplifiées par PCR en utilisant les amorces citées en (A), les fragments d'ADN obtenus et le plasmide luciférase « PGL3 basic ». Les étapes de ligation et de transformation ont été accomplies suivant le kit TAKARA® B) La construction 1 contient toutes les séquences SBE au nombre de sept (en rouge) présentes en amont du gène DNMT3OS, la construction 4 contient les deux séquences les plus proches du miR-199a2, la construction 5 ne contient qu'une seule séquence SBE, et enfin la construction contrôle ne contient aucune séquence SBE. C) Les cellules MRC5 ont été déplétées en sérum 3h avant stimulation TGF-β. (Jour1): les constructions ont été transfectées à 50 ng dans les MRC5. (jour2): stimulation des MRC5 avec du TGF-β à 10ng/ml pour 6-12 et 24h, les contrôles non traités TGF-β ont été arrêtés à 24h. Ces résultats préliminaires montrent que le TGF-β induit l'expression des constructions 1, 4 avec un pic d'expression à 12h. La construction 5 avec un seul SBE est moins efficace. Les deux séquences SBE de la construction 4 (vert) semblent être les plus importantes pour induire l'expression du pré-miR-199a2.

1) Régulation de l'expression du cluster miR-199a~214

Il n'y a pas de corrélation établie entre l'expression des dynamines et l'expression des miARN présents dans ce cluster, suggérant que les miARN sont sous le contrôle de leur propre promoteur (Gu and Chan 2012). Ainsi, l'expression de DNM3OS a été montrée régulée par différents facteurs de transcription, comme EGR1 (Early growth response protein 1) ou TWIST-1 (Loebel, Tsoi et al. 2005) qui activent son expression dans certains cancers (Sakurai, Furukawa et al. 2011). A l'inverse, STAT3 a été impliqué dans sa répression dans les cardiomyocytes (Haghikia, Missol-Kolka et al. 2011). Plusieurs études ont montré également que la région promotrice de pri-miR-199a-1 et pri-miR-199a-2 était hyperméthylée dans plusieurs cancers, alors qu'elle ne l'est pas ou peu dans les fibroblastes normaux (Kim, Lee et al. 2008). Ainsi, une baisse d'expression de miR-199a~214 a été observée dans les cancers du testicule et corrélée à une hyperméthylation de la région promotrice de pri-miR-199a-2 (DNM3OS) (Cheung, Lee et al. 2010). Des observations similaires ont été réalisées dans le cancer du poumon non-à-petites-cellules, le cancer colorectal et le cancer du sein (Mudduluru, Ceppi et al. 2011) (Tableau 12).

Il semblerait que dans les fibroblastes pulmonaires humains, les deux pri-miARN (199a1 et 199a2) soient exprimés. Néanmoins, dans la mesure où nous observons une cinétique et un facteur d'induction similaire entre miR-199a-5p et miR-214 après stimulation par le TGF- β 1, nous privilégions le locus DNM3OS comme source majoritaire des miARN matures. Il est à noter que DNM3OS est également surexprimé *in vivo* après traitement avec la bléomycine. Afin de savoir si une régulation directe du promoteur de DNM3OS par le TGF- β existait, j'ai effectué un certain nombre de constructions luciférase de la région promotrice de DNM3OS afin de mesurer son activité en présence ou en l'absence de TGF- β 1. Nos résultats, non publiés, valident cette hypothèse et indiquent un site SBE préférentiel situé approximativement à 500 pb en amont du site d'initiation de transcription (**Figure 30**). Ainsi le TGF- β participe non seulement à la maturation de miR-199a-5p/ 3p, mais aussi à la transcription du pri-miR-199a2 / DNM3OS dans les fibroblastes pulmonaires.

2) Stratégie d'identification des cibles de miR-199a-5p

Afin de sélectionner les cibles les plus significatives dans le développement de la fibrose pulmonaire, nous avons utilisé une stratégie combinant des approches expérimentales et bioinformatiques, ce qui nous a permis de réduire le nombre de cibles prédites par les outils bioinformatiques. Après surexpression de miR-199a-5p dans les fibroblastes pulmonaires, nous avons combiné les prédictions de trois algorithmes différents à savoir miRanda, Pictar et

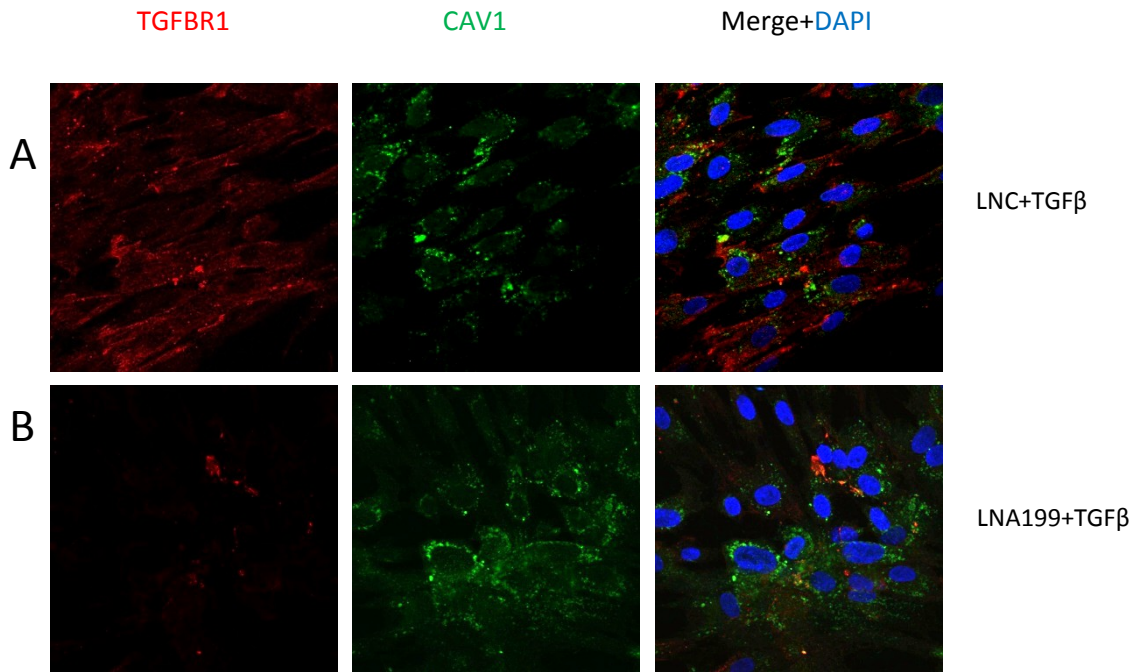


Figure 31: L'inhibition de MiR-199a-5p augmente la dégradation du récepteur au TGF-β par CAV-1. A-B) Expérience d'immunofluorescence représentant le TGFB^R1 (en rouge), la CAV1 (en vert), ainsi que la combinaison avec DAPI (noyau en bleu). Les cellules MRC5 ont été transfectées avec 10nM de LNC ou bien de LNA-199a-5p, 24h après transfection, les cellules ont été déplétées en sérum 3h puis stimulées avec du TGF-β (10ng/ml) pour 24h. **(A)** Le TGF-β induit une diminution d'expression de CAV1 accompagnée d'une augmentation d'expression du TGFB^R1 **(B)** L'inhibition de miR-199a-5P induit une augmentation d'expression de CAV1 et d'une diminution de l'expression du récepteur TGRBR1.

TargetScan sur une sélection de gènes réprimés en utilisant un seuil de P-Value stringent (0,001). Cette sélection drastique nous a d'abord permis de réduire à 21 le nombre de candidats, qui étaient initialement de l'ordre de plusieurs centaines. Cette liste a encore été réduite ensuite à 4 cibles potentielles (ARHGAP12, CAV1, MAP3K11 et MPP5) en croisant l'expression de ces 21 gènes avec les résultats de transcriptome obtenus dans le modèle bléomycine. Parmi ces derniers candidats, CAV1 apparaissait comme prioritaire, puisqu'il avait déjà été préalablement associé à la fibrose pulmonaire (Wang, Zhang et al. 2006). Afin de valider ces observations, nous avons alors combiné des expériences de validation de cible *in vitro* (test luciférase, qPCR, western blot) et de corrélation d'expression *in vivo* en utilisant une large cohorte de patients atteints de FPI. L'ensemble de ces résultats démontrent que miR-199a-5p joue un rôle majeur dans la diminution d'expression de CAV1 lors de la fibrogénèse pulmonaire, à la fois chez l'homme et la souris.

3) MiR-199a-5p, un amplificateur de la voie du TGF- β via la modulation de CAV-1

Nous avons montré que miR-199a-5p, en ciblant la CAV-1 induisait une boucle de rétrocontrôle positif, responsable d'une exacerbation du signal TGF- β dans la fibrose pulmonaire. L'endocytose des récepteurs au TGF- β via les clathrines favorise la signalisation du TGF- β , alors que la voie d'internalisation dépendante des cavéolines induit une dégradation des récepteurs au TGF- β , diminuant ainsi sa signalisation en aval (Chen and Wang 2009). J'ai effectué quelques expériences complémentaires non publiées qui semblent conforter ce modèle. Un co-marquage CAV1 / TGFBR1 après stimulation par le TGF- β 1 en présence ou en l'absence d'un inhibiteur de miR-199a-5p indique en effet que l'inhibition de miR-199a-5p a pour conséquence un renforcement du marquage CAV1 associé à une diminution du marquage pour le récepteur du TGF- β (**figure 31**).

L'inhibition du gène CAV-1 chez la souris a révélé la grande importance de cette protéine et son rôle dans différentes pathologies telle que le cancer, les maladies cardiovasculaires et la fibrose pulmonaire (Razani, Engelman et al. 2001 ; Wang, Zhang et al. 2006). De manière similaire à nos résultats, Wang et ses collaborateurs ont ainsi observé une diminution significative de l'expression de CAV-1 dans les tissus pulmonaires et les fibroblastes issus de patients atteints de FPI (Wang, Zhang et al. 2006). Le traitement par le TGF- β sur des fibroblastes pulmonaires *in vitro* induit également une perte d'expression progressive de CAV-1 d'une manière dose-dépendante. Nos résultats ont permis de décortiquer le mécanisme moléculaire impliqué et d'ajouter un niveau supérieur de contrôle de l'expression des cavéoles par les miARN. Il reste à caractériser l'impact spécifique de CAV1 parmi les

Tableau 4 : régulation et fonction de MiR-199a dans les cancers humains (D'après Gu, 2012)

Cancer	miR-199a Expression	miR-199a Involved Biological Processes	Validated Targets #	References
Renal cell cancer (RCC)	Down-regulated in RCC cells and tissues		GSK-3 β (protein only)	(Tsukigi, Bilim et al. 2012)
Gastric cancer *	miR-199a-3p up-regulated in patients with recurrence, miR-199a up-regulated in gastric cancer/metastatic tissues/Japanese gastric cancer tissues	Promotes proliferation and metastasis, progression-related	MAP3K11 (protein only)	(Song, Zeng et al. 2010) (Brenner, Hoshen et al. 2011) (Ueda, Volinia et al. 2010)
Biliary tract cancer	miR-199a-3p up-regulated during malignancy			(Shigehara, Yokomuro et al. 2011)
Human hepatocellular carcinoma (HCC)	miR-199a down-regulated	Anti-proliferation, anti-growth of HCC, PAK4/Raf/MEK/ERK pathway, anti-invasion modulator of cell cycle	HIF-1 α (protein), PAK4 (protein), CD44 (mRNA), DDR1 (mRNA), mTOR (mRNA)	(Hou, Lin et al. 2011) (Jiang, Gusev et al. 2008) (Qu, Zhang et al. 2011)
Hepatoblastoma	miR-199a up-regulated			(Magrelli, Azzalin et al. 2009)
Osteosarcoma	miR-199a down-regulated in cells and tissues	Anti-proliferation, anti-migration and affect cell cycle	MET? mTOR? STAT3?	(Duan, Choy et al. 2011)
Esophageal adenocarcinoma	miR-199a-3p and -5p up-regulated in worse survival patients			(Feber, Xi et al. 2011)
Testicular germ cell tumors	miR-199a-3p and -5p down-regulated in cells and tissues	anti-invasion, anti-migration, anti-proliferation	PODXL (mRNA)	(Cheung, Davis et al. 2011)
Breast Cancer	miR-199a down-regulated in tissues			(Wang, Zheng et al. 2010)
Sezary Syndrom (T-cell lymphoma)	miR-199a-3p up-regulated	Anti-apoptosis	EVL (host gene of miR-342)	(Ballabio, Mitchell et al. 2010)
Ovarian cancer *	miR-199a-2 up-regulated in ovarian cancer stem cells; miR-199a down-regulated in serous ovarian cancer tissues	IKK β /NF κ B pathway, Poor prognosis related, tumor progression related, anti-tumor progression and chemoresistance	IKK β (protein)	(Yin, Chen et al. 2010) (Iorio, Visone et al. 2007) (Yang, Kong et al. 2008) (Chen, Alvero et al. 2008)

Melanoma	miR-199a up-regulated in older adults (>60)	TLR-MyD88-NFκB pathway		(Jukic, Rao et al. 2010)
Uveal melanoma	miR-199a-3p and -5p up-regulated during metastasis			(Worley, Long et al. 2008)
Bladder cancer	miR-199a-3p down-regulated in cells and tissues	Tumor suppressive	KRT7 (mRNA)	(Ichimi, Enokida et al. 2009)
Bronchial squamous cancer	miR-199a up-regulated at a specific stage			(Mascaux, Laes et al. 2009)
Cervical Cancer	miR-199a up-regulated	Pro-proliferation of cells		(Lee, Choi et al. 2008)
Acute myeloid leukemia	miR-199a up-regulation in worse survival			(Garzon, Volinia et al. 2008)

* : Suggéré d'être un marqueur de diagnostic; # **(Protein only)** : la cible a été confirmée comme étant affectées uniquement au niveau de l'expression protéique sans changement d'expression de l'ARNm; **(protein)** : la cible a été confirmé pour avoir des changements au niveau protéique mais aucun test n'a été mené concernant les changements du niveau d'ARNm; **(ARNm)** : signifie à la fois l'ARNm et l'expression des protéines son dérégulés. **?**: Les cibles n'ont pas été vérifiées pour être directement inhibée par miR-199a.

autres cibles de miR-199a-5p, validées (**Tableau 4**) ou qui restent à valider, ce qui représente un travail considérable. Néanmoins, CAV1 apparaît comme une cible fonctionnellement relevante, et la démonstration définitive de son implication dans la fibrogénèse pulmonaire *in vivo* pourrait être apportée par l'utilisation de TSB CAV-1 permettant de retrouver des taux d'expression physiologiques de CAV-1 et ainsi supprimer ce cercle vicieux amplifiant la voie du TGF- β .

4) D'autres effets liés à la perte de CAV-1 dans les poumons ?

La diminution de l'expression de CAV-1 s'accompagne d'une déstabilisation de CAV-2, ce qui est également le cas quand nous surexprimons miR-199a-5p dans des fibroblastes pulmonaires. La perte des cavéoles dans le poumon, par délétion du gène CAV-1 ou CAV-2, induit des défauts histologiques significatifs. Ainsi, le diamètre des espaces alvéolaires est réduit, les parois alvéolaires sont plus épaisses avec un dépôt excessif de matrice extracellulaire (Wang, Zhang et al. 2006). Une analyse immunohistochimique en utilisant un marqueur de prolifération Ki67, montre clairement une augmentation de la prolifération cellulaire dans les poumons de souris CAV-1^{-/-}. Une analyse similaire avec un marqueur endothélial FIK-1 (récepteur du facteur de croissance endothélial vasculaire), révèle une augmentation du marquage endothélial dans les souris CAV^{-/-} (Drab, Verkade et al. 2001; Razani, Engelman et al. 2001). Une perturbation du cycle cellulaire peut être une des causes de ce phénotype, étant donné la prolifération rapide observée dans les MEF Cav-1^{-/-}. De plus, les études sur les mêmes souris montrent que CAV-1 joue un rôle important dans la régulation du NO, qui est fortement produit et induirait par son médiateur cGMP des phénomènes d'hypertension, de choc, et d'inflammation (Razani, Engelman et al. 2001; Razani, Woodman et al. 2002). Cependant, contre toute attente Shivshankar et ses collaborateurs ont observé que les souris CAV-1^{-/-} était résistantes à la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine. L'effet protecteur peut être expliqué par une diminution de l'apoptose et de la sénescence des cellules épithéliales lors de la phase inflammatoire initiale (Shivshankar, Brampton et al. 2012). L'inhibition totale de la CAV-1 n'est donc pas une approche appropriée pour comprendre les effets profibrotiques induits par la bléomycine. Dans ce sens, nous avons pu constater qu'un siCAV-1 induisait en partie un profil de gènes distinct comparé à une surexpression de miR-199a-5p. Il est aussi important de noter que la surexpression d'un miARN n'induit pas une perte totale de la protéine cible, à savoir CAV-1, et ainsi pourrait réguler la voie TGF- β sans perturber d'autres mécanismes induits par une absence totale de CAV-1.

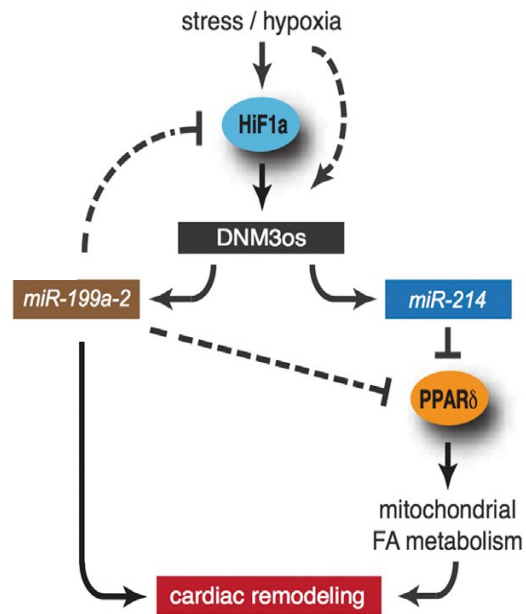


Figure 32: Modèle représentant l'activation de l'expression du cluster miR-199a~214 en réponse à l'hypoxie liée à l'insuffisance cardiaque. L'induction d'expression de miR-214 et miR-199a5p qui en résulte, est responsable d'une inhibition d'expression de PPAR γ perturbant ainsi le métabolisme des acides gras et induisant un remodelage cardiaque (D'après El Azzouzi, 2013).

5) MiR-199a-5p, un activateur universel de la différenciation des cellules mésenchymateuses ?

Nous avons montré que miR-199a-5p colocalisait avec les foyers de fibroblastes riches en α -SMA dans les biopsies pulmonaires de souris traitées à la bléomycine. Cette découverte nous a permis par la suite de montrer que miR-199a-5p jouait un rôle important dans l'activation des fibroblastes en myofibroblastes dans le poumon, mais aussi dans les reins et dans le foie. Nos résultats indiquant notamment *in vitro* que l'expression ectopique de miR-199a-5p a pour conséquence la stimulation de la phosphorylation de Smad2/3 et de l'activité d'une construction SBE luciférase renforcent notre hypothèse indiquant que miR-199a-5p est un activateur de la voie du TGF- β . Cependant, ces résultats sont en désaccord avec l'étude récente réalisée par Yan Zhang et al qui ont montré que miR-199a-5p était au contraire inhibiteur de la voie du TGF- β dans les cancers gastriques en ciblant SMAD4 (Zhang, Fan et al. 2012). Ces résultats contradictoires peuvent être expliqués par une méthodologie expérimentale et un contexte cellulaire différent. Premièrement, Yan Zhang et al ont surexprimé une banque de miARN incluant miR-199a-5p dans des fibroblastes NIH-3T3 en présence d'une construction 3'UTR luc-SMAD4 pour la validation de la cible, puis ils ont validé la diminution d'expression de SMAD4 endogène dans des cellules épithéliales HepG2. Cette méthode est contestable, car ils n'ont à aucun moment de l'étude validé la répression de l'expression de la protéine SMAD4 endogène dans les fibroblastes. En effet, les cellules mésenchymateuses et épithéliales répondent différemment au TGF- β , ce qui explique probablement ce résultat.

Des études montrent que le locus DNM3OS est également surexprimé *via* l'activation des facteurs Hif1 α /Twist1 (Loebel, Tsoi et al. 2005 ; Yang, Wu et al. 2008), en réponse à l'hypoxie liée, notamment à un contexte d'insuffisance cardiaque (El Azzouzi, Leptidis et al. 2013). Ainsi, l'induction d'expression de miR-214 et miR-199a-5p qui en résulte, est responsable d'une inhibition directe de l'expression de PPAR γ , de façon concomitante par les deux miARN (**figure 32**) (El Azzouzi, Leptidis et al. 2013). En accord avec ces résultats, nous observons également une diminution de l'expression de l'ARNm de PPAR γ en réponse à une surexpression de miR-199a-5p dans les fibroblastes pulmonaires. De manière intéressante, il a été montré que l'activation de PPAR γ inhibait la différenciation des myofibroblastes *via* l'inhibition de la phosphorylation de la kinase FAK en réponse au TGF- β dans les fibroblastes de patients IPF, induisant ainsi une inhibition de la voie PI3K-Akt (Kulkarni, Thatcher et al. 2011). L'ensemble de ces résultats suggèrent fortement que miR-199a-5p pourrait activer la

différenciation des myofibroblastes non seulement à travers la voie canonique du TGF- β mais aussi en activant d'autres voies alternatives.

6) D'autres fonctions pour miR-199a-5p ?

Dans notre étude, nous avons choisi de nous focaliser sur la phase non inflammatoire et tardive de la fibrose chez la souris, qui commence à partir du cinquième jour après instillation bléomycine. Ce choix a été fait, car les patients atteints de FPI ont peu d'inflammation, et dans ce sens il n'y avait pas une réelle relevance clinique. Cependant, on ne peut exclure le rôle inflammatoire que pourrait avoir miR-199a-5p. En effet, nos résultats montrent qu'une surexpression de miR-199a-5p dans les fibroblastes pulmonaires induit également une augmentation significative de plusieurs voies inflammatoires impliquées dans la fibrose, notamment la voie IL-1 (Gieling, Wallace et al. 2009), la réaction de phase aigüe (Greenwel and Rojkind 1997), la voie P38 MAPK (Ponticos, Holmes et al. 2009) ou bien encore la voie TWEAK/Fn14 (Sanz, Sanchez-Nino et al. 2011). Il serait donc intéressant d'évaluer l'effet de la surexpression de miR-199a-5p en co-culture avec des cellules épithéliales ou bien encore inflammatoires afin de mieux comprendre son rôle potentiel dans le chimiotactisme.

7) Quel lien entre miR-21 et miR-199a-5p ?

Nos résultats montrent que miR-21 est aussi surexprimé dans notre modèle de fibrose pulmonaire, cette observation ayant été décrite plusieurs fois dans la littérature. MiR-21 a été impliqué dans différentes fibroses tissulaires, à savoir la fibrose pulmonaire (Liu, Friggeri et al. 2010), mais aussi la fibrose rénale (Zhong, Chung et al. 2011), la fibrose cardiaque (Thum, Gross et al. 2008) et la fibrose hépatique (Zhang, Gao et al. 2013). Mir-21 représente donc un contrôle intéressant, c'est pourquoi lors de notre étude nous avons voulu comparer les effets liés à une surexpression de miR-199a-5p et celle de miR-21 dans les fibroblastes pulmonaires. Tous deux sont impliqués dans l'exacerbation de la voie du TGF- β , en inhibant l'expression de SMAD7 dans le cas de miR-21 (Liu, Friggeri et al. 2010), alors que pour miR-199a-5p, c'est en inhibant l'expression de CAV-1 empêchant ainsi la dégradation du récepteur TGF- β par les cavéoles. De manière intéressante, malgré l'implication des deux miARN dans l'exacerbation de la voie du TGF- β et la régulation du cycle cellulaire, les autres voies canoniques impliquant les deux miARN sont très distinctes (Table S1 de l'article Plos Genetics). De plus, nous avons constaté lors de la comparaison des miARN dérégulés entre les deux souches de souris sensibles ou non à la fibrose, une surexpression de miR-21 dans les poumons de souris BALB/C après instillation bléomycine, alors que l'induction de miR-199a-5p était spécifique de la souche sensible. Ces résultats renforcent le rôle profibrotique unique

de miR-199a-5p, en suggérant qu'il est lié au déclenchement d'une fibrose irréversible. Il est néanmoins acquis que miR-21 et miR-199a-5p jouent un rôle complémentaire dans la progression de la fibrose et qu'ils constituent tous deux des cibles thérapeutiques attractives. La synergie potentielle entre ces deux miARN dans la fibrose reste à être caractérisée en détail, notamment l'effet de leur double inhibition *in vivo* dans un modèle de fibrose tissulaire.

8) Synergie entre les miARN du locus DNM3OS ?

Nos résultats montrent que 14 jours après instillation de bléomycine, les transcrits primaires pri-miR-199a-1 et pri-miR-199a-2 sont surexprimés, ces résultats ayant été confirmés parallèlement *in vitro* après stimulation par le TGF- β . De plus, la surexpression du transcrit 199a-2 (DNM3OS) corrèle avec une augmentation d'expression des trois miARN matures, à savoir miR-199a-5p, miR-199a-3p et miR-214. Cette surexpression nous a permis d'émettre l'hypothèse d'un rôle synergique entre ces miARN dans la progression de la fibrose pulmonaire. Dans une étude préliminaire, on a analysé l'impact de l'expression ectopique des deux autres miARN du cluster sur l'expression de l' α -SMA. MiR-199a-3p n'induit pas de surexpression d' α -SMA, indiquant qu'il n'est pas suffisant à lui tout seul pour activer les fibroblastes pulmonaires *in vitro*. Une étude récente de Murakami et coll. montre une corrélation entre l'expression de miR-199a-3p et la progression de la fibrose hépatique, ce qui renforce notre observation (Murakami, Toyoda et al. 2011). Toutefois, le mécanisme par lequel miR-199a-3p participe à la fibrose reste non élucidé. Une hypothèse propose qu'il pourrait cibler DNMT3a, responsable du maintien du statut méthylé dans le génome humain (Chen, Gu et al. 2013). L'altération de son expression induit également une surexpression de MMP-2 et MMP-9 et pourrait ainsi contribuer à la progression de la fibrose (Boeker, Haberkorn et al. 2002 ; Chen, Wang et al. 2011 ; Gu and Chan 2012; Iizuka, Ogawa et al. 2012). Cependant, on ne peut pas exclure que miR-199a-3p pourrait au contraire jouer un rôle antagoniste de celui, profibrotique de miR-199a-5p en ciblant la fibronectine, ce qui nécessite d'être mieux étudié dans la fibrose pulmonaire (Lee, Shatseva et al. 2009).

Nos résultats indiquent au contraire que la surexpression de miR-214 induit une augmentation d'expression d' α -SMA (résultats non publiés). Les cibles de miR-214 sont actuellement à l'étude dans notre laboratoire, notamment en ce qui concerne la voie du TGF- β . D'autre part, miR-214 semble jouer un rôle protecteur contre l'apoptose induite par FAS-L. Le rôle protecteur contre l'apoptose de miR-214 est décrit notamment dans le cancer des ovaires et a été lié à une diminution de PTEN qui est une cible directe de miR-214 (Cheng,

Byrom et al. 2005; Yang, Kong et al. 2008). Cependant, l'inhibition de PTEN par miR-214 n'a pas pu être confirmée dans nos fibroblastes pulmonaires (hFL1 ou MRC5). Nous avons mis en évidence que miR-214 était une cible directe de COX-2 et induisant ainsi un défaut d'expression de la prostaglandine E2 (PGE-2). Il semblerait donc que la surexpression de miR-214 pourrait être à l'origine d'un défaut de réparation épithéliale médiée par la voie PGE-2/KGF/HGF (hypothèse actuellement à l'étude). On pourrait donc imaginer qu'une inhibition des deux miARN serait efficace pour à la fois augmenter l'apoptose des myofibroblastes et empêcher leur activation *de novo* induite par le TGF- β .

De plus, miR-214 semble jouer un rôle important dans la régulation de l'angiogenèse. Une étude récente montre que miR-214, sécrété par les exosomes dans les cellules endothéliales, stimule l'angiogenèse en ciblant ATM (ataxia telangiectasia mutated) dans la cellule réceptrice (van Balkom, de Jong et al. 2013). Cependant, d'autres études montrent qu'au contraire miR-214 inhibe l'activité angiogénique des cellules endothéliales HUVEC en inhibant de manière indirecte l'expression de l'oxyde nitrique synthase endothéliale (eNOS), connue pour activer la différenciation des cellules endothéliales (Chan, Yue et al. 2009 ; Rippe, Blimline et al. 2012) ou bien encore en ciblant le facteur de transcription Quaking et ainsi diminuer les facteurs proangiogéniques comme VEGF, FGF et PDGF (van Mil, Grundmann et al. 2012). Le rôle de miR-214 dans la dérégulation de l'angiogenèse dans la FPI mérite donc d'être mieux étudiée.

9) Les modèles de souris KO

L'invalidation de miR-199a-1 a été effectuée et les souris chimères ont été produites mais le phénotype n'a pas encore été publié. Cependant, les séquences matures de miR-199a-1 et miR-199a-2 sont 100% identiques, et le miR199b conserve 100% d'identité pour miR-199a-3p et 100% pour la région seed de miR-199b-5p, suggérant qu'il sera probablement nécessaire d'envisager un triple KO, afin d'enlever les biais de compensation par les autres séquences des miR matures. L'invalidation du locus complet DNM3OS (miR-199a-2/miR-214) chez la souris est létal et semble jouer un rôle particulièrement important dans le développement osseux et la croissance de l'embryon (Watanabe, Sato et al. 2008), suggérant un rôle important des miARN miR-199a-2 et miR-214 dans la croissance et le développement. Cependant, les souris KO pour miR-214 sont viables, mais manifestent après lésion d'ischémie-reperfusion, certaines myopathies, notamment une perte de la contractilité cardiaque, une augmentation de l'apoptose et une fibrose excessive (Aurora, Mahmoud et al. 2012). Il serait donc intéressant de générer un Ko miR-199a-5p (DNM3os) en suivant la

même stratégie utilisé par Aurora et al. Cependant, on constate que les KO de miARN n'ont pas ou peu d'effets délétères dans des conditions non stressantes. En effet, il est souvent nécessaire d'induire des conditions de stress intenses afin de mettre en évidence les conséquences fonctionnelles liées à une perte d'un miARN. Ces observations peuvent être expliquées par un effet compensatoire des autres miARN partageant les mêmes séquences seed. Il est donc nécessaire de combiner de multiples stratégies expérimentales afin de mieux comprendre le fonctionnement des miARN.

10) Potentiel thérapeutique d'un inhibiteur dirigé contre miR-199a-5p ?

Durant ces derniers mois, nous avons débuté l'évaluation du potentiel thérapeutique d'un inhibiteur de miR-199a-5p dans le modèle de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine. Ce modèle très utilisé est le modèle « préclinique » le plus fréquent pour tester de nouvelles hypothèses thérapeutiques pour la FPI. Ce modèle présente néanmoins un certain nombre de limites. En effet, l'histoire des lésions et leur évolution est très différente entre la situation pathologique chez homme et le modèle murin. Chez la souris, la phase inflammatoire est ainsi symptomatique avec une installation de fibrose peu évolutive (Chua, Gauldie et al. 2005). Alors que chez l'homme, la fibrose est d'installation silencieuse sans manifestation de phase inflammatoire et son caractère est plutôt progressif avec des phases d'exacerbations aiguës (Selman, Thannickal et al. 2004 ; Collard, Moore et al. 2007).

Nous avons tout d'abord mis au point une instillation intra-trachéale de bléomycine à l'aide d'un microsprayeur, ce qui nous a permis de d'observer une distribution plus homogène de la bléomycine dans chaque poumon, comparé à une simple instillation par injection. Nous avons ensuite validé l'observation de lésions pulmonaires comparables à celle d'une pneumopathie interstitielle commune, à l'aide d'un CT-Scan et d'un marquage immunohistochimique H&E pour la validation du dépôt excessif de MEC dans de foyers fibroblastiques, et enfin nous avons validé par PCR quantitative la dérégulation d'expression des miR-199a5p/3p et miR-214, parallèlement à la sous-expression de CAV-1 par western blot. Lors de nos expériences, on a pu constater une importante mortalité, induite par la méthode d'instillation « par exposition trachéale » ce qui ne suffit pas à voir le franchissement de la glotte et augmente ainsi le risque de traumatisme du larynx, pouvant exacerber les réactions inflammatoires au moment de l'opération liée aux propriétés hautement irritantes de la bléomycine. Une méthode d'instillation avec un contrôle direct à l'aide d'un laryngoscope a été mise en place récemment et cela a permis de supprimer ces risques de traumatismes et d'éviter l'exposition trachéale.

L'utilisation *in vivo* d'un « LNA-anti miR-199a-5p » a permis de diminuer certains marqueurs profibrotiques comme la fibronectine et le collagène¹. En parallèle, on observe une diminution d'expression de miR-199a-5p et une augmentation de l'expression de sa cible CAV-1. Néanmoins, une des limites des résultats obtenus concerne le nombre réduits d'animaux utilisés (n=5 en moyenne), limitant ainsi la pertinence des résultats obtenus et l'affinité relativement faible de ce premier inhibiteur utilisé (12 nts) qui ne bloquent que partiellement l'expression du miARN endogène. Toutefois, ces résultats sont encourageants et nécessitent d'être poursuivie avec un nombre plus conséquent de souris et un nouvel oligonucléotide modifié, un peu plus long (15 nts).

Les résultats des premiers essais cliniques du « miravirsén », l'inhibiteur de miR-122, pour le traitement de patients atteints du virus de l'hépatite C, sont très encourageants et a permis d'établir la preuve de concept pour l'utilisation d'inhibiteurs de miARN comme outils thérapeutiques (Janssen, Reesink et al. 2013). Ceci devrait stimuler l'utilisation de ce type de stratégie thérapeutique pour le traitement d'autres pathologies incluant la FPI. Toutefois, des études comparatives entre les différentes molécules, et notamment leurs modifications chimiques est nécessaire, afin de choisir les molécules les moins toxiques tout en préservant la réponse clinique la plus efficace. Dans ce contexte, l'utilisation d'antagomiRs ou bien de « LNA » dirigés contre miR-21 pour traiter la fibrose cardiaque *in vivo*, montre que les effets observés peuvent être différent en fonction de la nature chimique de l'inhibiteur. En effet, alors que les antagomiRs protègent contre la fibrose cardiaque (Thum, Gross et al. 2008), les « tiny LNA » n'ont aucun effet (Patrick, Montgomery et al. 2010). Un autre point important à souligner concerne l'innocuité de ces molécules à long terme, mais aussi les effets secondaires potentiels. En effet, une surexpression de la famille miR-29 pourrait promouvoir la formation d'anévrismes en dégradant excessivement la MEC engendrant ainsi une perturbation de l'intégrité des parois vasculaires (Boon, Seeger et al. 2011). De plus, certaines modifications chimiques utilisées au niveau des oligonucléotides peuvent être toxiques, en particulier l'ajout de phosphorothioate qui peut augmenter le temps de coagulation et induire une réponse inflammatoire (Sheehan and Phan 2001 ; Bennett and Swayze 2010).

11) miR-199a-5p un bio-marqueur de diagnostic et/ou pronostic ?

Les miARN sont sécrétés dans la majorité des fluides extracellulaires, comme le sang (Mitchell, Parkin et al. 2008 ; Glowacki, Savary et al. 2013) ou bien l'urine (Wang, Kwan et al. 2012 ; Channavajjhala, Rossato et al. 2013). Contrairement à d'autres molécules d'ARN

sensibles à la dégradation par les RNases, les miARN circulants sont stables dans les échantillons de sérum congelé. Cette stabilité est liée en partie à leur accumulation dans des corps membranaires appelés exosomes, ces derniers protégeant les miARN et assurant leur transport. Cette notion assez récente suggère par ailleurs un nouveau mode de communication inter cellulaire et extra cellulaire, ce qui élargit encore la fonction des miARN en leur associant un rôle « d'hormone » (Mitchell, Parkin et al. 2008; Simons and Raposo 2009).

MiR-199a-5p a été montré dérégulé dans le sang des patients atteints de la maladie du Crohn qui est une maladie inflammatoire chronique intestinale, qui comme la fibrose pulmonaire évolue par poussées (Fasseu, Treton et al. 2010 ; Wu, Guo et al. 2011). Cela suggère une fonction inflammatoire pour miR-199a-5p, et il serait donc intéressant de mesurer également son taux d'expression dans le sérum des patients IPF. Si son expression corrélait avec l'apparition des phases d'exacerbation, il représenterait un marqueur pronostic utile qui aiderait à anticiper le traitement des phases d'exacerbation, bien souvent mortelles pour les patients (Collard, Moore et al. 2007). La deuxième hypothèse serait d'évaluer son rôle dans le diagnostic précoce, notamment chez les patients ayant des antécédents familiaux de FPI. De plus, il serait intéressant de comparer le niveau d'expression de miR-199a-5p avec le pronostic des patients (notamment survie globale), mais aussi des complications afférentes. Cette hypothèse est actuellement à l'étude dans notre laboratoire, en collaboration avec des cliniciens sur un grand nombre d'échantillons de sérums de patients IPF collectés dans le cadre de la cohorte prospective Française « CO-FI ».

REFERENCES

- (2002). "American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Consensus Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias. This joint statement of the American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS) was adopted by the ATS board of directors, June 2001 and by the ERS Executive Committee, June 2001." Am J Respir Crit Care Med **165**(2): 277-304.
- Abbott, A. L., E. Alvarez-Saavedra, et al. (2005). "The let-7 MicroRNA family members mir-48, mir-84, and mir-241 function together to regulate developmental timing in *Caenorhabditis elegans*." Dev Cell **9**(3): 403-14.
- Abraham, D. J. and J. Varga (2005). "Scleroderma: from cell and molecular mechanisms to disease models." Trends Immunol **26**(11): 587-95.
- Adamali, H. I. and T. M. Maher (2012). "Current and novel drug therapies for idiopathic pulmonary fibrosis." Drug Des Devel Ther **6**: 261-72.
- Agostini, C. and C. Gurrieri (2006). "Chemokine/cytokine cocktail in idiopathic pulmonary fibrosis." Proc Am Thorac Soc **3**(4): 357-63.
- Akiri, G., E. Sabo, et al. (2003). "Lysyl oxidase-related protein-1 promotes tumor fibrosis and tumor progression in vivo." Cancer Res **63**(7): 1657-66.
- Alder, J. K., J. J. Chen, et al. (2008). "Short telomeres are a risk factor for idiopathic pulmonary fibrosis." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(35): 13051-6.
- Ambros, V. (1989). "A hierarchy of regulatory genes controls a larva-to-adult developmental switch in *C. elegans*." Cell **57**(1): 49-57.
- Ambros, V. (2008). "The evolution of our thinking about microRNAs." Nat Med **14**(10): 1036-40.
- Ambros, V., B. Bartel, et al. (2003). "A uniform system for microRNA annotation." RNA **9**(3): 277-9.
- Ameres, S. L., J. Martinez, et al. (2007). "Molecular basis for target RNA recognition and cleavage by human RISC." Cell **130**(1): 101-12.
- Anderson, R. G., B. A. Kamen, et al. (1992). "Potocytosis: sequestration and transport of small molecules by caveolae." Science **255**(5043): 410-1.
- Antic, M., J. H. Distler, et al. (2013). "Treating skin and lung fibrosis in systemic sclerosis: a future filled with promise?" Curr Opin Pharmacol **13**(3): 455-62.
- Antoniou, K. M., N. Tzanakis, et al. (2008). "Different angiogenic CXC chemokine levels in bronchoalveolar lavage fluid after interferon gamma-1b therapy in idiopathic pulmonary fibrosis patients." Pulm Pharmacol Ther **21**(6): 840-4.
- Antoniou, S. A. (2012). "Nintedanib (BIBF 1120) for IPF: a tomorrow therapy?" Multidiscip Respir Med **7**(1): 41.
- Aurora, A. B., A. I. Mahmoud, et al. (2012). "MicroRNA-214 protects the mouse heart from ischemic injury by controlling Ca(2+)(+) overload and cell death." J Clin Invest **122**(4): 1222-32.
- Babizhayev, M. A., E. L. Savel'yeva, et al. (2011). "Telomere length is a biomarker of cumulative oxidative stress, biologic age, and an independent predictor of survival and therapeutic treatment requirement associated with smoking behavior." Am J Ther **18**(6): e209-26.
- Baek, D., J. Villen, et al. (2008). "The impact of microRNAs on protein output." Nature **455**(7209): 64-71.
- Ballabio, E., T. Mitchell, et al. (2010). "MicroRNA expression in Sezary syndrome: identification, function, and diagnostic potential." Blood **116**(7): 1105-13.
- Balli, D., V. Ustiyani, et al. (2013). "Foxm1 transcription factor is required for lung fibrosis and epithelial-to-mesenchymal transition." EMBO J **32**(2): 231-44.
- Bandeira, C. D., A. S. Rubin, et al. (2009). "Prevalence of gastroesophageal reflux disease in patients with idiopathic pulmonary fibrosis." J Bras Pneumol **35**(12): 1182-9.
- Baran, C. P., J. M. Opalek, et al. (2007). "Important roles for macrophage colony-stimulating factor, CC chemokine ligand 2, and mononuclear phagocytes in the pathogenesis of pulmonary fibrosis." Am J Respir Crit Care Med **176**(1): 78-89.
- Barry-Hamilton, V., R. Spangler, et al. (2010). "Allosteric inhibition of lysyl oxidase-like-2 impedes the development of a pathologic microenvironment." Nat Med **16**(9): 1009-17.

- Bartel, D. P. (2004). "MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function." *Cell* **116**(2): 281-97.
- Bartel, D. P. (2009). "MicroRNAs: target recognition and regulatory functions." *Cell* **136**(2): 215-33.
- Bartram, U. and C. P. Speer (2004). "The role of transforming growth factor beta in lung development and disease." *Chest* **125**(2): 754-65.
- Bashkirov, V. I., H. Scherthan, et al. (1997). "A mouse cytoplasmic exoribonuclease (mXRN1p) with preference for G4 tetraplex substrates." *J Cell Biol* **136**(4): 761-73.
- Baskerville, S. and D. P. Bartel (2005). "Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring miRNAs and host genes." *RNA* **11**(3): 241-7.
- Basset, F., V. J. Ferrans, et al. (1986). "Intraluminal fibrosis in interstitial lung disorders." *Am J Pathol* **122**(3): 443-61.
- Bazzini, A. A., M. T. Lee, et al. (2012). "Ribosome profiling shows that miR-430 reduces translation before causing mRNA decay in zebrafish." *Science* **336**(6078): 233-7.
- Bellini, A. and S. Mattoli (2007). "The role of the fibrocyte, a bone marrow-derived mesenchymal progenitor, in reactive and reparative fibroses." *Lab Invest* **87**(9): 858-70.
- Belperio, J. A., M. Dy, et al. (2002). "Interaction of IL-13 and C10 in the pathogenesis of bleomycin-induced pulmonary fibrosis." *Am J Respir Cell Mol Biol* **27**(4): 419-27.
- Bennett, C. F. and E. E. Swayze (2010). "RNA targeting therapeutics: molecular mechanisms of antisense oligonucleotides as a therapeutic platform." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **50**: 259-93.
- Bernardo, B. C., X. M. Gao, et al. (2012). "Therapeutic inhibition of the miR-34 family attenuates pathological cardiac remodeling and improves heart function." *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**(43): 17615-20.
- Bertero, T., S. Grosso, et al. (2012). "'Seed-Milarity' confers to hsa-miR-210 and hsa-miR-147b similar functional activity." *PLoS One* **7**(9): e44919.
- Bertero, T., K. Robbe-Sermesant, et al. (2013). "microRNAs target identification: lessons from hypoxamiRs." *Antioxid Redox Signal*.
- Bhattacharyya, S. N., R. Habermacher, et al. (2006). "Relief of microRNA-mediated translational repression in human cells subjected to stress." *Cell* **125**(6): 1111-24.
- Blahna, M. T. and A. Hata (2013). "Regulation of miRNA biogenesis as an integrated component of growth factor signaling." *Curr Opin Cell Biol* **25**(2): 233-40.
- Blobe, G. C., W. P. Schieman, et al. (2000). "Role of transforming growth factor beta in human disease." *N Engl J Med* **342**(18): 1350-8.
- Boeker, K. H., C. I. Haberkorn, et al. (2002). "Diagnostic potential of circulating TIMP-1 and MMP-2 as markers of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C." *Clin Chim Acta* **316**(1-2): 71-81.
- Bogatkevich, G. S., E. Tourkina, et al. (2001). "Thrombin differentiates normal lung fibroblasts to a myofibroblast phenotype via the proteolytically activated receptor-1 and a protein kinase C-dependent pathway." *J Biol Chem* **276**(48): 45184-92.
- Boon, R. A., K. Iekushi, et al. (2013). "MicroRNA-34a regulates cardiac ageing and function." *Nature* **495**(7439): 107-10.
- Boon, R. A., T. Seeger, et al. (2011). "MicroRNA-29 in aortic dilation: implications for aneurysm formation." *Circ Res* **109**(10): 1115-9.
- Braun, J., C. Hoang-Vu, et al. (2010). "Downregulation of microRNAs directs the EMT and invasive potential of anaplastic thyroid carcinomas." *Oncogene* **29**(29): 4237-44.
- Brenner, B., M. B. Hoshen, et al. (2011). "MicroRNAs as a potential prognostic factor in gastric cancer." *World J Gastroenterol* **17**(35): 3976-85.
- Briata, P., W. J. Lin, et al. (2012). "PI3K/AKT signaling determines a dynamic switch between distinct KSRP functions favoring skeletal myogenesis." *Cell Death Differ* **19**(3): 478-87.
- Bucala, R., L. A. Spiegel, et al. (1994). "Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair." *Mol Med* **1**(1): 71-81.
- Butz, H., I. Liko, et al. (2011). "MicroRNA profile indicates downregulation of the TGFbeta pathway in sporadic non-functioning pituitary adenomas." *Pituitary* **14**(2): 112-24.
- Butz, H., K. Racz, et al. (2012). "Crosstalk between TGF-beta signaling and the microRNA machinery." *Trends Pharmacol Sci* **33**(7): 382-93.

- Calabrese, F., A. Kipar, et al. (2013). "Herpes virus infection is associated with vascular remodeling and pulmonary hypertension in idiopathic pulmonary fibrosis." *PLoS One* **8**(2): e55715.
- Cantin, A. M., R. C. Hubbard, et al. (1989). "Glutathione deficiency in the epithelial lining fluid of the lower respiratory tract in idiopathic pulmonary fibrosis." *Am Rev Respir Dis* **139**(2): 370-2.
- Cao, B., Z. Guo, et al. (2000). "The potential role of PDGF, IGF-1, TGF-beta expression in idiopathic pulmonary fibrosis." *Chin Med J (Engl)* **113**(9): 776-82.
- Casas, E., J. Kim, et al. (2011). "Snail2 is an essential mediator of Twist1-induced epithelial mesenchymal transition and metastasis." *Cancer Res* **71**(1): 245-54.
- Chan, L. S., P. Y. Yue, et al. (2009). "Role of microRNA-214 in ginsenoside-Rg1-induced angiogenesis." *Eur J Pharm Sci* **38**(4): 370-7.
- Channavajjhala, S. K., M. Rossato, et al. (2013). "Optimizing the purification and analysis of miRNAs from urinary exosomes." *Clin Chem Lab Med*: 1-10.
- Chau, B. N., C. Xin, et al. (2012). "MicroRNA-21 promotes fibrosis of the kidney by silencing metabolic pathways." *Sci Transl Med* **4**(121): 121ra18.
- Chaudhary, N. I., G. J. Roth, et al. (2007). "Inhibition of PDGF, VEGF and FGF signalling attenuates fibrosis." *Eur Respir J* **29**(5): 976-85.
- Cheloufi, S., C. O. Dos Santos, et al. (2010). "A dicer-independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis." *Nature* **465**(7298): 584-9.
- Chen, B. F., S. Gu, et al. (2013). "microRNA-199a-3p, DNMT3A, and aberrant DNA methylation in testicular cancer." *Epigenetics* **9**(1).
- Chen, K. C., Y. S. Wang, et al. (2011). "OxLDL up-regulates microRNA-29b, leading to epigenetic modifications of MMP-2/MMP-9 genes: a novel mechanism for cardiovascular diseases." *FASEB J* **25**(5): 1718-28.
- Chen, P., J. K. McGuire, et al. (2008). "Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 moderates airway re-epithelialization by regulating matrilysin activity." *Am J Pathol* **172**(5): 1256-70.
- Chen, R., A. B. Alvero, et al. (2008). "Regulation of IKKbeta by miR-199a affects NF-kappaB activity in ovarian cancer cells." *Oncogene* **27**(34): 4712-23.
- Chen, Y. G. and X. F. Wang (2009). "A special issue on TGF-beta signaling." *Cell Res* **19**(1): 1-2.
- Cheng, A. M., M. W. Byrom, et al. (2005). "Antisense inhibition of human miRNAs and indications for an involvement of miRNA in cell growth and apoptosis." *Nucleic Acids Res* **33**(4): 1290-7.
- Cheung, H. H., A. J. Davis, et al. (2011). "Methylation of an intronic region regulates miR-199a in testicular tumor malignancy." *Oncogene* **30**(31): 3404-15.
- Cheung, H. H., T. L. Lee, et al. (2010). "Genome-wide DNA methylation profiling reveals novel epigenetically regulated genes and non-coding RNAs in human testicular cancer." *Br J Cancer* **102**(2): 419-27.
- Chi, S. W., J. B. Zang, et al. (2009). "Argonaute HITS-CLIP decodes microRNA-mRNA interaction maps." *Nature* **460**(7254): 479-86.
- Cho, J. H., R. Gelinas, et al. (2011). "Systems biology of interstitial lung diseases: integration of mRNA and microRNA expression changes." *BMC Med Genomics* **4**: 8.
- Choe, J., H. Cho, et al. (2010). "microRNA/Argonaute 2 regulates nonsense-mediated messenger RNA decay." *EMBO Rep* **11**(5): 380-6.
- Chua, F., J. Gauldie, et al. (2005). "Pulmonary fibrosis: searching for model answers." *Am J Respir Cell Mol Biol* **33**(1): 9-13.
- Chung, A. C., X. R. Huang, et al. (2010). "miR-192 mediates TGF-beta/Smad3-driven renal fibrosis." *J Am Soc Nephrol* **21**(8): 1317-25.
- Cifuentes, D., H. Xue, et al. (2010). "A novel miRNA processing pathway independent of Dicer requires Argonaute2 catalytic activity." *Science* **328**(5986): 1694-8.
- Clark, D. A. and R. Coker (1998). "Transforming growth factor-beta (TGF-beta)." *Int J Biochem Cell Biol* **30**(3): 293-8.
- Collard, H. R., C. S. Calfee, et al. (2010). "Plasma biomarker profiles in acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **299**(1): L3-7.
- Collard, H. R., B. B. Moore, et al. (2007). "Acute exacerbations of idiopathic pulmonary fibrosis." *Am J Respir Crit Care Med* **176**(7): 636-43.

- Corcoran, D. L., K. V. Pandit, et al. (2009). "Features of mammalian microRNA promoters emerge from polymerase II chromatin immunoprecipitation data." *PLoS One* **4**(4): e5279.
- Corrin, B., A. Dewar, et al. (1985). "Fine structural changes in cryptogenic fibrosing alveolitis and asbestosis." *J Pathol* **147**(2): 107-19.
- Coultras, D. B., R. E. Zumwalt, et al. (1994). "The epidemiology of interstitial lung diseases." *Am J Respir Crit Care Med* **150**(4): 967-72.
- Crystal, R. G., P. B. Bitterman, et al. (2002). "Future research directions in idiopathic pulmonary fibrosis: summary of a National Heart, Lung, and Blood Institute working group." *Am J Respir Crit Care Med* **166**(2): 236-46.
- Crystal, R. G., P. B. Bitterman, et al. (1984). "Interstitial lung diseases of unknown cause. Disorders characterized by chronic inflammation of the lower respiratory tract." *N Engl J Med* **310**(4): 235-44.
- da Costa Martins, P. A., K. Salic, et al. (2010). "MicroRNA-199b targets the nuclear kinase Dyrk1a in an auto-amplification loop promoting calcineurin/NFAT signalling." *Nat Cell Biol* **12**(12): 1220-7.
- Dall'Aglio, P. P., A. Pesci, et al. (1988). "Study of immune complexes in bronchoalveolar lavage fluids." *Respiration* **54 Suppl 1**: 36-41.
- Daniels, C. E., J. A. Lasky, et al. (2010). "Imatinib treatment for idiopathic pulmonary fibrosis: Randomized placebo-controlled trial results." *Am J Respir Crit Care Med* **181**(6): 604-10.
- Daniels, C. E., M. C. Wilkes, et al. (2004). "Imatinib mesylate inhibits the profibrogenic activity of TGF-beta and prevents bleomycin-mediated lung fibrosis." *J Clin Invest* **114**(9): 1308-16.
- Davis-Dusenbery, B. N., M. C. Chan, et al. (2011). "down-regulation of Kruppel-like factor-4 (KLF4) by microRNA-143/145 is critical for modulation of vascular smooth muscle cell phenotype by transforming growth factor-beta and bone morphogenetic protein 4." *J Biol Chem* **286**(32): 28097-110.
- Davis, B. N., A. C. Hilyard, et al. (2008). "SMAD proteins control DROSHA-mediated microRNA maturation." *Nature* **454**(7200): 56-61.
- Davis, B. N., A. C. Hilyard, et al. (2010). "Smad proteins bind a conserved RNA sequence to promote microRNA maturation by Drosha." *Mol Cell* **39**(3): 373-84.
- De Vries, J., B. L. Kessels, et al. (2001). "Quality of life of idiopathic pulmonary fibrosis patients." *Eur Respir J* **17**(5): 954-61.
- Denby, L., V. Ramdas, et al. (2013). "MicroRNA-214 Antagonism Protects against Renal Fibrosis." *J Am Soc Nephrol*.
- Denby, L., V. Ramdas, et al. (2011). "miR-21 and miR-214 are consistently modulated during renal injury in rodent models." *Am J Pathol* **179**(2): 661-72.
- Di Meglio, F., C. Castaldo, et al. (2010). "Epithelial-mesenchymal transition of epicardial mesothelium is a source of cardiac CD117-positive stem cells in adult human heart." *J Mol Cell Cardiol* **49**(5): 719-27.
- Diatloff-Zito, C., A. J. Gordon, et al. (1995). "Isolation of an ubiquitously expressed cDNA encoding human dynamin II, a member of the large GTP-binding protein family." *Gene* **163**(2): 301-6.
- Didiano, D. and O. Hobert (2006). "Perfect seed pairing is not a generally reliable predictor for miRNA-target interactions." *Nat Struct Mol Biol* **13**(9): 849-51.
- Djuranovic, S., A. Nahvi, et al. (2012). "miRNA-mediated gene silencing by translational repression followed by mRNA deadenylation and decay." *Science* **336**(6078): 237-40.
- Doench, J. G. and P. A. Sharp (2004). "Specificity of microRNA target selection in translational repression." *Genes Dev* **18**(5): 504-11.
- Drab, M., P. Verkade, et al. (2001). "Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice." *Science* **293**(5539): 2449-52.
- Duan, Z., E. Choy, et al. (2011). "MicroRNA-199a-3p is downregulated in human osteosarcoma and regulates cell proliferation and migration." *Mol Cancer Ther* **10**(8): 1337-45.
- Duisters, R. F., A. J. Tijssen, et al. (2009). "miR-133 and miR-30 regulate connective tissue growth factor: implications for a role of microRNAs in myocardial matrix remodeling." *Circ Res* **104**(2): 170-8, 6p following 178.
- Duursma, A. M., M. Kedde, et al. (2008). "miR-148 targets human DNMT3b protein coding region." *RNA* **14**(5): 872-7.

- Ebert, M. S. and P. A. Sharp (2010). "Emerging roles for natural microRNA sponges." *Curr Biol* **20**(19): R858-61.
- Ebert, M. S. and P. A. Sharp (2012). "Roles for microRNAs in conferring robustness to biological processes." *Cell* **149**(3): 515-24.
- Ebner, O. A. and M. Selbach (2011). "Whole cell proteome regulation by microRNAs captured in a pulsed SILAC mass spectrometry approach." *Methods Mol Biol* **725**: 315-31.
- Egan, J. J., H. I. Adamali, et al. (2011). "Ganciclovir antiviral therapy in advanced idiopathic pulmonary fibrosis: an open pilot study." *Pulm Med* **2011**: 240805.
- El Azzouzi, H., S. Leptidis, et al. (2013). "The Hypoxia-Inducible MicroRNA Cluster miR-199a approximately 214 Targets Myocardial PPARdelta and Impairs Mitochondrial Fatty Acid Oxidation." *Cell Metab* **18**(3): 341-54.
- Elbashir, S. M., J. Harborth, et al. (2001). "Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells." *Nature* **411**(6836): 494-8.
- Engelman, J. A., X. L. Zhang, et al. (1998). "Genes encoding human caveolin-1 and -2 are co-localized to the D7S522 locus (7q31.1), a known fragile site (FRA7G) that is frequently deleted in human cancers." *FEBS Lett* **436**(3): 403-10.
- Eulalio, A., S. Helms, et al. (2009). "A C-terminal silencing domain in GW182 is essential for miRNA function." *RNA* **15**(6): 1067-77.
- Eulalio, A., J. Rehwinkel, et al. (2007). "Target-specific requirements for enhancers of decapping in miRNA-mediated gene silencing." *Genes Dev* **21**(20): 2558-70.
- Eystathiou, T., E. K. Chan, et al. (2002). "A phosphorylated cytoplasmic autoantigen, GW182, associates with a unique population of human mRNAs within novel cytoplasmic speckles." *Mol Biol Cell* **13**(4): 1338-51.
- Fang, K. C. (2000). "Mesenchymal regulation of alveolar repair in pulmonary fibrosis." *Am J Respir Cell Mol Biol* **23**(2): 142-5.
- Farazi, T. A., S. A. Juranek, et al. (2008). "The growing catalog of small RNAs and their association with distinct Argonaute/Piwi family members." *Development* **135**(7): 1201-14.
- Fasseu, M., X. Treton, et al. (2010). "Identification of restricted subsets of mature microRNA abnormally expressed in inactive colonic mucosa of patients with inflammatory bowel disease." *PLoS One* **5**(10).
- Fattman, C. L. (2008). "Apoptosis in pulmonary fibrosis: too much or not enough?" *Antioxid Redox Signal* **10**(2): 379-85.
- Fazi, F., A. Rosa, et al. (2005). "A minicircuitry comprised of microRNA-223 and transcription factors NFI-A and C/EBPalpha regulates human granulopoiesis." *Cell* **123**(5): 819-31.
- Feber, A., L. Xi, et al. (2011). "MicroRNA prognostic signature for nodal metastases and survival in esophageal adenocarcinoma." *Ann Thorac Surg* **91**(5): 1523-30.
- Fehrenbach, H., M. Kasper, et al. (1999). "Differential immunolocalization of VEGF in rat and human adult lung, and in experimental rat lung fibrosis: light, fluorescence, and electron microscopy." *Anat Rec* **254**(1): 61-73.
- Fire, A., S. Xu, et al. (1998). "Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*." *Nature* **391**(6669): 806-11.
- Forman, J. J., A. Legesse-Miller, et al. (2008). "A search for conserved sequences in coding regions reveals that the let-7 microRNA targets Dicer within its coding sequence." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(39): 14879-84.
- Fra, A. M., E. Williamson, et al. (1995). "De novo formation of caveolae in lymphocytes by expression of VIP21-caveolin." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(19): 8655-9.
- Frid, M. G., V. A. Kale, et al. (2002). "Mature vascular endothelium can give rise to smooth muscle cells via endothelial-mesenchymal transdifferentiation: in vitro analysis." *Circ Res* **90**(11): 1189-96.
- Fukuda, T., K. Yamagata, et al. (2007). "DEAD-box RNA helicase subunits of the Drosha complex are required for processing of rRNA and a subset of microRNAs." *Nat Cell Biol* **9**(5): 604-11.
- Fulmer, J. D., M. S. Sposovska, et al. (1978). "Distribution of HLA antigens in idiopathic pulmonary fibrosis." *Am Rev Respir Dis* **118**(1): 141-7.
- Gaidatzis, D., E. van Nimwegen, et al. (2007). "Inference of miRNA targets using evolutionary conservation and pathway analysis." *BMC Bioinformatics* **8**: 69.

- Galasso, M., M. E. Sana, et al. (2010). "Non-coding RNAs: a key to future personalized molecular therapy?" Genome Med **2**(2): 12.
- Garcia, C. K. (2011). "Idiopathic pulmonary fibrosis: update on genetic discoveries." Proc Am Thorac Soc **8**(2): 158-62.
- Garzon, R., S. Volinia, et al. (2008). "MicroRNA signatures associated with cytogenetics and prognosis in acute myeloid leukemia." Blood **111**(6): 3183-9.
- Gauldie, J. (2002). "Pro: Inflammatory mechanisms are a minor component of the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis." Am J Respir Crit Care Med **165**(9): 1205-6.
- Gauldie, J., P. Bonniaud, et al. (2007). "TGF-beta, Smad3 and the process of progressive fibrosis." Biochem Soc Trans **35**(Pt 4): 661-4.
- Gharaee-Kermani, M., R. E. McCullumsmith, et al. (2003). "CC-chemokine receptor 2 required for bleomycin-induced pulmonary fibrosis." Cytokine **24**(6): 266-76.
- Ghildiyal, M. and P. D. Zamore (2009). "Small silencing RNAs: an expanding universe." Nat Rev Genet **10**(2): 94-108.
- Ghosh, A. K., S. B. Murphy, et al. (2013). "Global gene expression profiling in PAI-1 knockout murine heart and kidney: molecular basis of cardiac-selective fibrosis." PLoS One **8**(5): e63825.
- Gieling, R. G., K. Wallace, et al. (2009). "Interleukin-1 participates in the progression from liver injury to fibrosis." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **296**(6): G1324-31.
- Gillissen, A. and D. Nowak (1998). "Characterization of N-acetylcysteine and ambroxol in anti-oxidant therapy." Respir Med **92**(4): 609-23.
- Glait, C., D. Ravid, et al. (2006). "Caveolin-1 controls BRCA1 gene expression and cellular localization in human breast cancer cells." FEBS Lett **580**(22): 5268-74.
- Glorian, V., G. Maillot, et al. (2011). "HuR-dependent loading of miRNA RISC to the mRNA encoding the Ras-related small GTPase RhoB controls its translation during UV-induced apoptosis." Cell Death Differ **18**(11): 1692-701.
- Glowacki, F., G. Savary, et al. (2013). "Increased circulating miR-21 levels are associated with kidney fibrosis." PLoS One **8**(2): e58014.
- Gorospe, M., K. Tominaga, et al. (2011). "Post-Transcriptional Control of the Hypoxic Response by RNA-Binding Proteins and MicroRNAs." Front Mol Neurosci **4**: 7.
- Govinden, R. and K. D. Bhoola (2003). "Genealogy, expression, and cellular function of transforming growth factor-beta." Pharmacol Ther **98**(2): 257-65.
- Greenwel, P. and M. Rojkind (1997). "Accelerated development of liver fibrosis in CCl4-treated rats by the weekly induction of acute phase response episodes: upregulation of alpha1(I) procollagen and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 mRNAs." Biochim Biophys Acta **1361**(2): 177-84.
- Gribbin, J., R. B. Hubbard, et al. (2006). "Incidence and mortality of idiopathic pulmonary fibrosis and sarcoidosis in the UK." Thorax **61**(11): 980-5.
- Griffiths-Jones, S., R. J. Grocock, et al. (2006). "miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature." Nucleic Acids Res **34**(Database issue): D140-4.
- Griffiths-Jones, S., H. K. Saini, et al. (2008). "miRBase: tools for microRNA genomics." Nucleic Acids Res **36**(Database issue): D154-8.
- Grimson, A., K. K. Farh, et al. (2007). "MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing." Mol Cell **27**(1): 91-105.
- Grunewald, J. and A. Eklund (2007). "Role of CD4+ T cells in sarcoidosis." Proc Am Thorac Soc **4**(5): 461-4.
- Grutters, J. C. and R. M. du Bois (2005). "Genetics of fibrosing lung diseases." Eur Respir J **25**(5): 915-27.
- Gu, S. and W. Y. Chan (2012). "Flexible and Versatile as a Chameleon-Sophisticated Functions of microRNA-199a." Int J Mol Sci **13**(7): 8449-66.
- Gu, S., L. Jin, et al. (2009). "Biological basis for restriction of microRNA targets to the 3' untranslated region in mammalian mRNAs." Nat Struct Mol Biol **16**(2): 144-50.
- Gu, S. and M. A. Kay (2010). "How do miRNAs mediate translational repression?" Silence **1**(1): 11.
- Guo, H., N. T. Ingolia, et al. (2010). "Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels." Nature **466**(7308): 835-40.

- Gurujeyalakshmi, G., M. A. Hollinger, et al. (1999). "Pirfenidone inhibits PDGF isoforms in bleomycin hamster model of lung fibrosis at the translational level." Am J Physiol **276**(2 Pt 1): L311-8.
- Ha, I., B. Wightman, et al. (1996). "A bulged lin-4/lin-14 RNA duplex is sufficient for *Caenorhabditis elegans* lin-14 temporal gradient formation." Genes Dev **10**(23): 3041-50.
- Hafner, M., M. Landthaler, et al. (2010). "Transcriptome-wide identification of RNA-binding protein and microRNA target sites by PAR-CLIP." Cell **141**(1): 129-41.
- Haghikia, A., E. Missol-Kolka, et al. (2011). "Signal transducer and activator of transcription 3-mediated regulation of miR-199a-5p links cardiomyocyte and endothelial cell function in the heart: a key role for ubiquitin-conjugating enzymes." Eur Heart J **32**(10): 1287-97.
- Hamilton, A. J. and D. C. Baulcombe (1999). "A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants." Science **286**(5441): 950-2.
- Hamman, L. and A. R. Rich (1935). "Fulminating Diffuse Interstitial Fibrosis of the Lungs." Trans Am Clin Climatol Assoc **51**: 154-63.
- Han, M. K., D. S. Bach, et al. (2013). "Sildenafil Preserves Exercise Capacity in IPF Patients with Right Ventricular Dysfunction." Chest.
- Hansell, A., J. Hollowell, et al. (1999). "Use of the General Practice Research Database (GPRD) for respiratory epidemiology: a comparison with the 4th Morbidity Survey in General Practice (MSGP4)." Thorax **54**(5): 413-9.
- Hansen, T. B., T. I. Jensen, et al. (2013). "Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges." Nature **495**(7441): 384-8.
- Hanumegowda, C., L. Farkas, et al. (2012). "Angiogenesis in pulmonary fibrosis: too much or not enough?" Chest **142**(1): 200-7.
- Hashimoto, N., H. Jin, et al. (2004). "Bone marrow-derived progenitor cells in pulmonary fibrosis." J Clin Invest **113**(2): 243-52.
- Hashimoto, N., S. H. Phan, et al. (2010). "Endothelial-mesenchymal transition in bleomycin-induced pulmonary fibrosis." Am J Respir Cell Mol Biol **43**(2): 161-72.
- Hendrickson, D. G., D. J. Hogan, et al. (2009). "Concordant regulation of translation and mRNA abundance for hundreds of targets of a human microRNA." PLoS Biol **7**(11): e1000238.
- Hernandez-Rodriguez, N. A., A. D. Cambrey, et al. (1995). "Role of thrombin in pulmonary fibrosis." Lancet **346**(8982): 1071-3.
- Hinz, B., S. H. Phan, et al. (2007). "The myofibroblast: one function, multiple origins." Am J Pathol **170**(6): 1807-16.
- Homolka, J. (1987). "Idiopathic pulmonary fibrosis: a historical review." CMAJ **137**(11): 1003-5.
- Hoo, Z. H. and M. K. Whyte (2012). "Idiopathic pulmonary fibrosis." Thorax **67**(8): 742-6.
- Hope-Gill, B. D., S. Hilldrup, et al. (2003). "A study of the cough reflex in idiopathic pulmonary fibrosis." Am J Respir Crit Care Med **168**(8): 995-1002.
- Horan, G. S., S. Wood, et al. (2008). "Partial inhibition of integrin $\alpha(v)\beta6$ prevents pulmonary fibrosis without exacerbating inflammation." Am J Respir Crit Care Med **177**(1): 56-65.
- Horowitz, J. C. and V. J. Thannickal (2006). "Idiopathic pulmonary fibrosis : new concepts in pathogenesis and implications for drug therapy." Treat Respir Med **5**(5): 325-42.
- Hou, J., L. Lin, et al. (2011). "Identification of miRNomes in human liver and hepatocellular carcinoma reveals miR-199a/b-3p as therapeutic target for hepatocellular carcinoma." Cancer Cell **19**(2): 232-43.
- Huang, M., X. J. Qi, et al. (2010). "[Role of connective tissue growth factor and α -smooth muscle actin in pulmonary fibrosis among acute paraquat poisoned rats]." Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi **28**(10): 729-34.
- Hullinger, T. G., R. L. Montgomery, et al. (2012). "Inhibition of miR-15 protects against cardiac ischemic injury." Circ Res **110**(1): 71-81.
- Hunninghake, G. W. (2005). "Antioxidant therapy for idiopathic pulmonary fibrosis." N Engl J Med **353**(21): 2285-7.
- Hunninghake, G. W., D. A. Lynch, et al. (2003). "Radiologic findings are strongly associated with a pathologic diagnosis of usual interstitial pneumonia." Chest **124**(4): 1215-23.
- Hutvagner, G. and M. J. Simard (2008). "Argonaute proteins: key players in RNA silencing." Nat Rev Mol Cell Biol **9**(1): 22-32.

- Ichimi, T., H. Enokida, et al. (2009). "Identification of novel microRNA targets based on microRNA signatures in bladder cancer." *Int J Cancer* **125**(2): 345-52.
- Iizuka, M., T. Ogawa, et al. (2012). "Induction of microRNA-214-5p in human and rodent liver fibrosis." *Fibrogenesis Tissue Repair* **5**(1): 12.
- Ikushima, H. and K. Miyazono (2010). "Cellular context-dependent "colors" of transforming growth factor-beta signaling." *Cancer Sci* **101**(2): 306-12.
- Ingelfinger, D., D. J. Arndt-Jovin, et al. (2002). "The human LSm1-7 proteins colocalize with the mRNA-degrading enzymes Dcp1/2 and Xrnl in distinct cytoplasmic foci." *RNA* **8**(12): 1489-501.
- Iorio, M. V., R. Visone, et al. (2007). "MicroRNA signatures in human ovarian cancer." *Cancer Res* **67**(18): 8699-707.
- Iyer, S. N., G. Gurujeyalakshmi, et al. (1999). "Effects of pirfenidone on procollagen gene expression at the transcriptional level in bleomycin hamster model of lung fibrosis." *J Pharmacol Exp Ther* **289**(1): 211-8.
- Jackson, R. J., C. U. Hellen, et al. (2010). "The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation." *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**(2): 113-27.
- Janssen, H. L., H. W. Reesink, et al. (2013). "Treatment of HCV infection by targeting microRNA." *N Engl J Med* **368**(18): 1685-94.
- Jiang, J., Y. Gusev, et al. (2008). "Association of MicroRNA expression in hepatocellular carcinomas with hepatitis infection, cirrhosis, and patient survival." *Clin Cancer Res* **14**(2): 419-27.
- John, B., A. J. Enright, et al. (2004). "Human MicroRNA targets." *PLoS Biol* **2**(11): e363.
- Jukic, D. M., U. N. Rao, et al. (2010). "MicroRNA profiling analysis of differences between the melanoma of young adults and older adults." *J Transl Med* **8**: 27.
- Kaneda, A., T. Fujita, et al. (2011). "Activation of Bmp2-Smad1 signal and its regulation by coordinated alteration of H3K27 trimethylation in Ras-induced senescence." *PLoS Genet* **7**(11): e1002359.
- Karakikes, I., A. H. Chaanine, et al. (2013). "Therapeutic cardiac-targeted delivery of miR-1 reverses pressure overload-induced cardiac hypertrophy and attenuates pathological remodeling." *J Am Heart Assoc* **2**(2): e000078.
- Kasai, H., J. T. Allen, et al. (2005). "TGF-beta1 induces human alveolar epithelial to mesenchymal cell transition (EMT)." *Respir Res* **6**: 56.
- Kasper, M. and G. Haroske (1996). "Alterations in the alveolar epithelium after injury leading to pulmonary fibrosis." *Histol Histopathol* **11**(2): 463-83.
- Katzenstein, A. L. and J. L. Myers (1998). "Idiopathic pulmonary fibrosis: clinical relevance of pathologic classification." *Am J Respir Crit Care Med* **157**(4 Pt 1): 1301-15.
- Keane, M. P., D. A. Arenberg, et al. (1997). "The CXC chemokines, IL-8 and IP-10, regulate angiogenic activity in idiopathic pulmonary fibrosis." *J Immunol* **159**(3): 1437-43.
- Kennerdell, J. R. and R. W. Carthew (1998). "Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that frizzled and frizzled 2 act in the wingless pathway." *Cell* **95**(7): 1017-26.
- Kim, S., U. J. Lee, et al. (2008). "MicroRNA miR-199a* regulates the MET proto-oncogene and the downstream extracellular signal-regulated kinase 2 (ERK2)." *J Biol Chem* **283**(26): 18158-66.
- Kinch, L. N. and N. V. Grishin (2009). "The human Ago2 MC region does not contain an eIF4E-like mRNA cap binding motif." *Biol Direct* **4**: 2.
- King, T. E., Jr., A. Pardo, et al. (2011). "Idiopathic pulmonary fibrosis." *Lancet* **378**(9807): 1949-61.
- Kiriakidou, M., G. S. Tan, et al. (2007). "An mRNA m7G cap binding-like motif within human Ago2 represses translation." *Cell* **129**(6): 1141-51.
- Klein, M. E., D. T. Liroy, et al. (2007). "Homeostatic regulation of MeCP2 expression by a CREB-induced microRNA." *Nat Neurosci* **10**(12): 1513-4.
- Knauss, J. L., S. Bian, et al. (2013). "Plasmid-based target protectors allow specific blockade of miRNA silencing activity in mammalian developmental systems." *Front Cell Neurosci* **7**: 163.
- Koinuma, D., S. Tsutsumi, et al. (2009). "Promoter-wide analysis of Smad4 binding sites in human epithelial cells." *Cancer Sci* **100**(11): 2133-42.
- Koinuma, D., S. Tsutsumi, et al. (2009). "Chromatin immunoprecipitation on microarray analysis of Smad2/3 binding sites reveals roles of ETS1 and TFAP2A in transforming growth factor beta signaling." *Mol Cell Biol* **29**(1): 172-86.

- Kolodsick, J. E., G. B. Toews, et al. (2004). "Protection from fluorescein isothiocyanate-induced fibrosis in IL-13-deficient, but not IL-4-deficient, mice results from impaired collagen synthesis by fibroblasts." *J Immunol* **172**(7): 4068-76.
- Kong, W., H. Yang, et al. (2008). "MicroRNA-155 is regulated by the transforming growth factor beta/Smad pathway and contributes to epithelial cell plasticity by targeting RhoA." *Mol Cell Biol* **28**(22): 6773-84.
- Konigshoff, M. and O. Eickelberg (2010). "WNT signaling in lung disease: a failure or a regeneration signal?" *Am J Respir Cell Mol Biol* **42**(1): 21-31.
- Korpal, M., E. S. Lee, et al. (2008). "The miR-200 family inhibits epithelial-mesenchymal transition and cancer cell migration by direct targeting of E-cadherin transcriptional repressors ZEB1 and ZEB2." *J Biol Chem* **283**(22): 14910-4.
- Kotsianidis, I., E. Nakou, et al. (2009). "Global impairment of CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells in idiopathic pulmonary fibrosis." *Am J Respir Crit Care Med* **179**(12): 1121-30.
- Koutsopoulos, O. S., C. Kretz, et al. (2013). "Dynamin 2 homozygous mutation in humans with a lethal congenital syndrome." *Eur J Hum Genet* **21**(6): 637-42.
- Kravis, T. C., A. Ahmed, et al. (1976). "Pathogenic mechanisms in pulmonary fibrosis: collagen-induced migration inhibition factor production and cytotoxicity mediated by lymphocytes." *J Clin Invest* **58**(5): 1223-32.
- Krek, A., D. Grun, et al. (2005). "Combinatorial microRNA target predictions." *Nat Genet* **37**(5): 495-500.
- Kropski, J. A., W. E. Lawson, et al. (2013). "Genetic studies provide clues on the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis." *Dis Model Mech* **6**(1): 9-17.
- Kulkarni, A. A., T. H. Thatcher, et al. (2011). "PPAR-gamma ligands repress TGFbeta-induced myofibroblast differentiation by targeting the PI3K/Akt pathway: implications for therapy of fibrosis." *PLoS One* **6**(1): e15909.
- Kulkarni, A. B., C. G. Huh, et al. (1993). "Transforming growth factor beta 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(2): 770-4.
- Kulkarni, M., S. Ozgur, et al. (2010). "On track with P-bodies." *Biochem Soc Trans* **38**(Pt 1): 242-51.
- Kumarswamy, R., I. Volkmann, et al. (2011). "Regulation and function of miRNA-21 in health and disease." *RNA Biol* **8**(5): 706-13.
- Kwiecinski, M., N. Elfimova, et al. (2012). "Expression of platelet-derived growth factor-C and insulin-like growth factor I in hepatic stellate cells is inhibited by miR-29." *Lab Invest* **92**(7): 978-87.
- Lagos-Quintana, M., R. Rauhut, et al. (2001). "Identification of novel genes coding for small expressed RNAs." *Science* **294**(5543): 853-8.
- Lappi-Blanco, E., Y. Soini, et al. (2002). "VEGF and bFGF are highly expressed in intraluminal fibromyxoid lesions in bronchiolitis obliterans organizing pneumonia." *J Pathol* **196**(2): 220-7.
- Lau, N. C., L. P. Lim, et al. (2001). "An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*." *Science* **294**(5543): 858-62.
- Le Brigand, K., K. Robbe-Sermesant, et al. (2010). "MiRonTop: mining microRNAs targets across large scale gene expression studies." *Bioinformatics* **26**(24): 3131-2.
- Lee, D. Y., T. Shatseva, et al. (2009). "A 3'-untranslated region (3'UTR) induces organ adhesion by regulating miR-199a* functions." *PLoS One* **4**(2): e4527.
- Lee, E. K., Y. S. Lee, et al. (2007). "Expression of Caveolin-1 reduces cellular responses to TGF-beta1 through down-regulating the expression of TGF-beta type II receptor gene in NIH3T3 fibroblast cells." *Biochem Biophys Res Commun* **359**(2): 385-90.
- Lee, J. S., H. R. Collard, et al. (2010). "Does chronic microaspiration cause idiopathic pulmonary fibrosis?" *Am J Med* **123**(4): 304-11.
- Lee, J. S., J. H. Ryu, et al. (2011). "Gastroesophageal reflux therapy is associated with longer survival in patients with idiopathic pulmonary fibrosis." *Am J Respir Crit Care Med* **184**(12): 1390-4.
- Lee, J. W., C. H. Choi, et al. (2008). "Altered MicroRNA expression in cervical carcinomas." *Clin Cancer Res* **14**(9): 2535-42.
- Lee, R. C. and V. Ambros (2001). "An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*." *Science* **294**(5543): 862-4.

- Lee, R. C., R. L. Feinbaum, et al. (1993). "The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*." *Cell* **75**(5): 843-54.
- Lee, Y. B., I. Bantounas, et al. (2009). "Twist-1 regulates the miR-199a/214 cluster during development." *Nucleic Acids Res* **37**(1): 123-8.
- Leopold, P. L., J. Vincent, et al. (2012). "A comparison of epithelial-to-mesenchymal transition and re-epithelialization." *Semin Cancer Biol* **22**(5-6): 471-83.
- Lewis, B. P., C. B. Burge, et al. (2005). "Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets." *Cell* **120**(1): 15-20.
- Li, N., A. S. Flynt, et al. (2008). "Dispatched Homolog 2 is targeted by miR-214 through a combination of three weak microRNA recognition sites." *Nucleic Acids Res* **36**(13): 4277-85.
- Lim, L. P., N. C. Lau, et al. (2005). "Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs." *Nature* **433**(7027): 769-73.
- Linden, P. A., R. J. Gilbert, et al. (2006). "Laparoscopic fundoplication in patients with end-stage lung disease awaiting transplantation." *J Thorac Cardiovasc Surg* **131**(2): 438-46.
- Lipardi, C., R. Mora, et al. (1998). "Caveolin transfection results in caveolae formation but not apical sorting of glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins in epithelial cells." *J Cell Biol* **140**(3): 617-26.
- Liu, G., A. Friggeri, et al. (2010). "miR-21 mediates fibrogenic activation of pulmonary fibroblasts and lung fibrosis." *J Exp Med* **207**(8): 1589-97.
- Liu, N., S. Bezprozvannaya, et al. (2008). "microRNA-133a regulates cardiomyocyte proliferation and suppresses smooth muscle gene expression in the heart." *Genes Dev* **22**(23): 3242-54.
- Liu, P., W. P. Li, et al. (1999). "Identification of caveolin-1 in lipoprotein particles secreted by exocrine cells." *Nat Cell Biol* **1**(6): 369-75.
- Liu, P., Y. Ying, et al. (1996). "Localization of platelet-derived growth factor-stimulated phosphorylation cascade to caveolae." *J Biol Chem* **271**(17): 10299-303.
- Loebel, D. A., B. Tsoi, et al. (2005). "A conserved noncoding intronic transcript at the mouse *Dnm3* locus." *Genomics* **85**(6): 782-9.
- Madar, S., I. Goldstein, et al. (2013). "Cancer associated fibroblasts--more than meets the eye." *Trends Mol Med* **19**(8): 447-53.
- Magrelli, A., G. Azzalin, et al. (2009). "Altered microRNA Expression Patterns in Hepatoblastoma Patients." *Transl Oncol* **2**(3): 157-63.
- Maher, T. M. (2010). "Pirfenidone in idiopathic pulmonary fibrosis." *Drugs Today (Barc)* **46**(7): 473-82.
- Marquez, R. T., S. Bandyopadhyay, et al. (2010). "Correlation between microRNA expression levels and clinical parameters associated with chronic hepatitis C viral infection in humans." *Lab Invest* **90**(12): 1727-36.
- Martinez-Outschoorn, U. E., S. Pavlides, et al. (2010). "Tumor cells induce the cancer associated fibroblast phenotype via caveolin-1 degradation: implications for breast cancer and DCIS therapy with autophagy inhibitors." *Cell Cycle* **9**(12): 2423-33.
- Mascaux, C., J. F. Laes, et al. (2009). "Evolution of microRNA expression during human bronchial squamous carcinogenesis." *Eur Respir J* **33**(2): 352-9.
- Massague, J., J. Seoane, et al. (2005). "Smad transcription factors." *Genes Dev* **19**(23): 2783-810.
- Matsuno, Y., A. L. Coelho, et al. (2012). "Notch signaling mediates TGF-beta1-induced epithelial-mesenchymal transition through the induction of *Snai1*." *Int J Biochem Cell Biol* **44**(5): 776-89.
- McKeown, S., A. G. Richter, et al. (2009). "MMP expression and abnormal lung permeability are important determinants of outcome in IPF." *Eur Respir J* **33**(1): 77-84.
- Meijer, H. A., Y. W. Kong, et al. (2013). "Translational repression and eIF4A2 activity are critical for microRNA-mediated gene regulation." *Science* **340**(6128): 82-5.
- Meyer, K. C., A. Cardoni, et al. (2000). "Vascular endothelial growth factor in bronchoalveolar lavage from normal subjects and patients with diffuse parenchymal lung disease." *J Lab Clin Med* **135**(4): 332-8.
- Michelfelder, S. and M. Trepel (2009). "Adeno-associated viral vectors and their redirection to cell-type specific receptors." *Adv Genet* **67**: 29-60.

- Milosevic, J., K. Pandit, et al. (2012). "Profibrotic role of miR-154 in pulmonary fibrosis." Am J Respir Cell Mol Biol **47**(6): 879-87.
- Min, H. and S. Yoon (2010). "Got target? Computational methods for microRNA target prediction and their extension." Exp Mol Med **42**(4): 233-44.
- Mineo, C., G. L. James, et al. (1996). "Localization of epidermal growth factor-stimulated Ras/Raf-1 interaction to caveolae membrane." J Biol Chem **271**(20): 11930-5.
- Miranda, K. C., T. Huynh, et al. (2006). "A pattern-based method for the identification of MicroRNA binding sites and their corresponding heteroduplexes." Cell **126**(6): 1203-17.
- Mitchell, P. S., R. K. Parkin, et al. (2008). "Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(30): 10513-8.
- Miyara, M., Z. Amoura, et al. (2006). "The immune paradox of sarcoidosis and regulatory T cells." J Exp Med **203**(2): 359-70.
- Monacci, W. T., M. J. Merrill, et al. (1993). "Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in normal rat tissues." Am J Physiol **264**(4 Pt 1): C995-1002.
- Monier, S., R. G. Parton, et al. (1995). "VIP21-caveolin, a membrane protein constituent of the caveolar coat, oligomerizes in vivo and in vitro." Mol Biol Cell **6**(7): 911-27.
- Monteys, A. M., R. M. Spengler, et al. (2010). "Structure and activity of putative intronic miRNA promoters." RNA **16**(3): 495-505.
- Montgomery, R. L., T. G. Hullinger, et al. (2011). "Therapeutic inhibition of miR-208a improves cardiac function and survival during heart failure." Circulation **124**(14): 1537-47.
- Moore, B. B., J. E. Kolodick, et al. (2005). "CCR2-mediated recruitment of fibrocytes to the alveolar space after fibrotic injury." Am J Pathol **166**(3): 675-84.
- Moore, B. B., R. Paine, 3rd, et al. (2001). "Protection from pulmonary fibrosis in the absence of CCR2 signaling." J Immunol **167**(8): 4368-77.
- Mora, A. L., E. Torres-Gonzalez, et al. (2006). "Activation of alveolar macrophages via the alternative pathway in herpesvirus-induced lung fibrosis." Am J Respir Cell Mol Biol **35**(4): 466-73.
- Mora, A. L., E. Torres-Gonzalez, et al. (2007). "Control of virus reactivation arrests pulmonary herpesvirus-induced fibrosis in IFN-gamma receptor-deficient mice." Am J Respir Crit Care Med **175**(11): 1139-50.
- Moss, E. G., R. C. Lee, et al. (1997). "The cold shock domain protein LIN-28 controls developmental timing in *C. elegans* and is regulated by the *lin-4* RNA." Cell **88**(5): 637-46.
- Mudduluru, G., P. Ceppi, et al. (2011). "Regulation of Axl receptor tyrosine kinase expression by miR-34a and miR-199a/b in solid cancer." Oncogene **30**(25): 2888-99.
- Mulugeta, S., V. Nguyen, et al. (2005). "A surfactant protein C precursor protein BRICHOS domain mutation causes endoplasmic reticulum stress, proteasome dysfunction, and caspase 3 activation." Am J Respir Cell Mol Biol **32**(6): 521-30.
- Murakami, Y., H. Toyoda, et al. (2011). "The progression of liver fibrosis is related with overexpression of the miR-199 and 200 families." PLoS One **6**(1): e16081.
- Murphy-Ullrich, J. E. and M. Poczatek (2000). "Activation of latent TGF-beta by thrombospondin-1: mechanisms and physiology." Cytokine Growth Factor Rev **11**(1-2): 59-69.
- Muth, M., K. Theophile, et al. (2010). "Hypoxia-induced down-regulation of microRNA-449a/b impairs control over targeted SERPINE1 (PAI-1) mRNA - a mechanism involved in SERPINE1 (PAI-1) overexpression." J Transl Med **8**: 33.
- Myers, J. L. and A. L. Katzenstein (2009). "Beyond a consensus classification for idiopathic interstitial pneumonias: progress and controversies." Histopathology **54**(1): 90-103.
- Napoli, C., C. Lemieux, et al. (1990). "Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into *Petunia* Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans." Plant Cell **2**(4): 279-289.
- Navaratnam, V., K. M. Fleming, et al. (2011). "The rising incidence of idiopathic pulmonary fibrosis in the U.K." Thorax **66**(6): 462-7.
- Nicholson, A. G. (2002). "Classification of idiopathic interstitial pneumonias: making sense of the alphabet soup." Histopathology **41**(5): 381-91.
- Nicholson, A. G., T. V. Colby, et al. (2000). "The prognostic significance of the histologic pattern of interstitial pneumonia in patients presenting with the clinical entity of cryptogenic fibrosing alveolitis." Am J Respir Crit Care Med **162**(6): 2213-7.

- Noble, P. W., C. Albera, et al. (2011). "Pirfenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis (CAPACITY): two randomised trials." Lancet **377**(9779): 1760-9.
- Noth, I., K. J. Anstrom, et al. (2012). "A placebo-controlled randomized trial of warfarin in idiopathic pulmonary fibrosis." Am J Respir Crit Care Med **186**(1): 88-95.
- Nottrott, S., M. J. Simard, et al. (2006). "Human let-7a miRNA blocks protein production on actively translating polyribosomes." Nat Struct Mol Biol **13**(12): 1108-14.
- Oba, S., S. Kumano, et al. (2010). "miR-200b precursor can ameliorate renal tubulointerstitial fibrosis." PLoS One **5**(10): e13614.
- Obad, S., C. O. dos Santos, et al. (2011). "Silencing of microRNA families by seed-targeting tiny LNAs." Nat Genet **43**(4): 371-8.
- Okamura, K., J. W. Hagen, et al. (2007). "The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in Drosophila." Cell **130**(1): 89-100.
- Olsen, P. H. and V. Ambros (1999). "The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in Caenorhabditis elegans by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation." Dev Biol **216**(2): 671-80.
- Orom, U. A., F. C. Nielsen, et al. (2008). "MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation." Mol Cell **30**(4): 460-71.
- Orth, J. D. and M. A. McNiven (2003). "Dynamin at the actin-membrane interface." Curr Opin Cell Biol **15**(1): 31-9.
- Ozsolak, F., L. L. Poling, et al. (2008). "Chromatin structure analyses identify miRNA promoters." Genes Dev **22**(22): 3172-83.
- Pan, Q., X. Luo, et al. (2010). "microRNA 21: response to hormonal therapies and regulatory function in leiomyoma, transformed leiomyoma and leiomyosarcoma cells." Mol Hum Reprod **16**(3): 215-27.
- Pan, Z., X. Sun, et al. (2012). "MicroRNA-101 inhibited postinfarct cardiac fibrosis and improved left ventricular compliance via the FBJ osteosarcoma oncogene/transforming growth factor-beta1 pathway." Circulation **126**(7): 840-50.
- Pandit, K. V., D. Corcoran, et al. (2010). "Inhibition and role of let-7d in idiopathic pulmonary fibrosis." Am J Respir Crit Care Med **182**(2): 220-9.
- Pandit, K. V., J. Milosevic, et al. (2011). "MicroRNAs in idiopathic pulmonary fibrosis." Transl Res **157**(4): 191-9.
- Panos, R. J., R. L. Mortenson, et al. (1990). "Clinical deterioration in patients with idiopathic pulmonary fibrosis: causes and assessment." Am J Med **88**(4): 396-404.
- Parker, R. and H. Song (2004). "The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover." Nat Struct Mol Biol **11**(2): 121-7.
- Pasquinelli, A. E., B. J. Reinhart, et al. (2000). "Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA." Nature **408**(6808): 86-9.
- Patrick, D. M., R. L. Montgomery, et al. (2010). "Stress-dependent cardiac remodeling occurs in the absence of microRNA-21 in mice." J Clin Invest **120**(11): 3912-6.
- Pechkovsky, D. V., A. Prasse, et al. (2010). "Alternatively activated alveolar macrophages in pulmonary fibrosis-mediator production and intracellular signal transduction." Clin Immunol **137**(1): 89-101.
- Perrot, C. Y., D. Javelaud, et al. (2013). "Insights into the Transforming Growth Factor-beta Signaling Pathway in Cutaneous Melanoma." Ann Dermatol **25**(2): 135-44.
- Petersen, C. P., M. E. Bordeleau, et al. (2006). "Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells." Mol Cell **21**(4): 533-42.
- Phillips, R. J., M. D. Burdick, et al. (2004). "Circulating fibrocytes traffic to the lungs in response to CXCL12 and mediate fibrosis." J Clin Invest **114**(3): 438-46.
- Pillai, R. S., S. N. Bhattacharyya, et al. (2005). "Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells." Science **309**(5740): 1573-6.
- Plataki, M., A. V. Koutsopoulos, et al. (2005). "Expression of apoptotic and antiapoptotic markers in epithelial cells in idiopathic pulmonary fibrosis." Chest **127**(1): 266-74.
- Ponticos, M., A. M. Holmes, et al. (2009). "Pivotal role of connective tissue growth factor in lung fibrosis: MAPK-dependent transcriptional activation of type I collagen." Arthritis Rheum **60**(7): 2142-55.

- Pottier, N., T. Maurin, et al. (2009). "Identification of keratinocyte growth factor as a target of microRNA-155 in lung fibroblasts: implication in epithelial-mesenchymal interactions." *PLoS One* **4**(8): e6718.
- Preall, J. B., Z. He, et al. (2006). "Short interfering RNA strand selection is independent of dsRNA processing polarity during RNAi in *Drosophila*." *Curr Biol* **16**(5): 530-5.
- Pulikkan, J. A., V. Dengler, et al. (2010). "Cell-cycle regulator E2F1 and microRNA-223 comprise an autoregulatory negative feedback loop in acute myeloid leukemia." *Blood* **115**(9): 1768-78.
- Putta, S., L. Lanting, et al. (2012). "Inhibiting microRNA-192 ameliorates renal fibrosis in diabetic nephropathy." *J Am Soc Nephrol* **23**(3): 458-69.
- Qin, W., A. C. Chung, et al. (2011). "TGF-beta/Smad3 signaling promotes renal fibrosis by inhibiting miR-29." *J Am Soc Nephrol* **22**(8): 1462-74.
- Qu, K. Z., K. Zhang, et al. (2011). "Circulating microRNAs as biomarkers for hepatocellular carcinoma." *J Clin Gastroenterol* **45**(4): 355-60.
- Qunn, L., T. Takemura, et al. (2002). "Hyperplastic epithelial foci in honeycomb lesions in idiopathic pulmonary fibrosis." *Virchows Arch* **441**(3): 271-8.
- Raghu, G., K. J. Anstrom, et al. (2012). "Prednisone, azathioprine, and N-acetylcysteine for pulmonary fibrosis." *N Engl J Med* **366**(21): 1968-77.
- Raghu, G. and J. Chang (2004). "Idiopathic pulmonary fibrosis: current trends in management." *Clin Chest Med* **25**(4): 621-36, v.
- Raghu, G., H. R. Collard, et al. (2011). "An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement: idiopathic pulmonary fibrosis: evidence-based guidelines for diagnosis and management." *Am J Respir Crit Care Med* **183**(6): 788-824.
- Raghu, G., T. D. Freudenberger, et al. (2006). "High prevalence of abnormal acid gastro-oesophageal reflux in idiopathic pulmonary fibrosis." *Eur Respir J* **27**(1): 136-42.
- Raghu, G. and D. R. Thickett (2013). "Pirfenidone for IPF: pro/con debate; the 'con' viewpoint." *Thorax* **68**(7): 605-8.
- Raghu, G., S. T. Yang, et al. (2006). "Sole treatment of acid gastroesophageal reflux in idiopathic pulmonary fibrosis: a case series." *Chest* **129**(3): 794-800.
- Razani, B., J. A. Engelman, et al. (2001). "Caveolin-1 null mice are viable but show evidence of hyperproliferative and vascular abnormalities." *J Biol Chem* **276**(41): 38121-38.
- Razani, B. and M. P. Lisanti (2001). "Caveolin-deficient mice: insights into caveolar function human disease." *J Clin Invest* **108**(11): 1553-61.
- Razani, B., S. E. Woodman, et al. (2002). "Caveolae: from cell biology to animal physiology." *Pharmacol Rev* **54**(3): 431-67.
- Razani, B., X. L. Zhang, et al. (2001). "Caveolin-1 regulates transforming growth factor (TGF)-beta/SMAD signaling through an interaction with the TGF-beta type I receptor." *J Biol Chem* **276**(9): 6727-38.
- Reinhart, B. J., F. J. Slack, et al. (2000). "The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*." *Nature* **403**(6772): 901-6.
- Richeldi, L. (2013). "Idiopathic pulmonary fibrosis: current challenges and future perspectives." *Eur Respir Rev* **22**(128): 103-5.
- Riha, R. L., E. E. Duhig, et al. (2002). "Survival of patients with biopsy-proven usual interstitial pneumonia and nonspecific interstitial pneumonia." *Eur Respir J* **19**(6): 1114-8.
- Rippe, C., M. Blimline, et al. (2012). "MicroRNA changes in human arterial endothelial cells with senescence: relation to apoptosis, eNOS and inflammation." *Exp Gerontol* **47**(1): 45-51.
- Rock, J. R., C. E. Barkauskas, et al. (2011). "Multiple stromal populations contribute to pulmonary fibrosis without evidence for epithelial to mesenchymal transition." *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(52): E1475-83.
- Romano, N. and G. Macino (1992). "Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences." *Mol Microbiol* **6**(22): 3343-53.
- Rose, C. E., Jr., S. S. Sung, et al. (2003). "Significant involvement of CCL2 (MCP-1) in inflammatory disorders of the lung." *Microcirculation* **10**(3-4): 273-88.
- Rubin, E. H. (1955). "Pulmonary lesions in rheumatoid disease with remarks on diffuse interstitial pulmonary fibrosis." *Am J Med* **19**(4): 569-82.

- Ruby, J. G., C. H. Jan, et al. (2007). "Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing." Nature **448**(7149): 83-6.
- Rucker, R. B. and J. Murray (1978). "Cross-linking amino acids in collagen and elastin." Am J Clin Nutr **31**(7): 1221-36.
- Ruggiero, T., M. Trabucchi, et al. (2009). "LPS induces KH-type splicing regulatory protein-dependent processing of microRNA-155 precursors in macrophages." FASEB J **23**(9): 2898-908.
- Ruvkun, G. and J. Giusto (1989). "The *Caenorhabditis elegans* heterochronic gene *lin-14* encodes a nuclear protein that forms a temporal developmental switch." Nature **338**(6213): 313-9.
- Saini, H. K., S. Griffiths-Jones, et al. (2007). "Genomic analysis of human microRNA transcripts." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(45): 17719-24.
- Sakamoto, K., H. Taniguchi, et al. (2012). "Acute exacerbation of IPF following diagnostic bronchoalveolar lavage procedures." Respir Med **106**(3): 436-42.
- Sakurai, K., C. Furukawa, et al. (2011). "MicroRNAs miR-199a-5p and -3p target the Brm subunit of SWI/SNF to generate a double-negative feedback loop in a variety of human cancers." Cancer Res **71**(5): 1680-9.
- Sanz, A. B., M. D. Sanchez-Nino, et al. (2011). "TWEAK, a multifunctional cytokine in kidney injury." Kidney Int **80**(7): 708-18.
- Scadding, J. G. (1960). "Chronic diffuse interstitial fibrosis of the lungs." Br Med J **1**(5171): 443-50.
- Scherer, P. E., T. Okamoto, et al. (1996). "Identification, sequence, and expression of caveolin-2 defines a caveolin gene family." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(1): 131-5.
- Schlegel, A., R. B. Schwab, et al. (1999). "A role for the caveolin scaffolding domain in mediating the membrane attachment of caveolin-1. The caveolin scaffolding domain is both necessary and sufficient for membrane binding in vitro." J Biol Chem **274**(32): 22660-7.
- Schnitzer, J. E., P. Oh, et al. (1994). "Filipin-sensitive caveolae-mediated transport in endothelium: reduced transcytosis, scavenger endocytosis, and capillary permeability of select macromolecules." J Cell Biol **127**(5): 1217-32.
- Schuppan, D. and Y. O. Kim (2013). "Evolving therapies for liver fibrosis." J Clin Invest **123**(5): 1887-901.
- Schwarz, D. S., G. Hutvagner, et al. (2003). "Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex." Cell **115**(2): 199-208.
- Seibold, M. A., A. L. Wise, et al. (2011). "A common MUC5B promoter polymorphism and pulmonary fibrosis." N Engl J Med **364**(16): 1503-12.
- Selman, M., T. E. King, et al. (2001). "Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy." Ann Intern Med **134**(2): 136-51.
- Selman, M. and A. Pardo (2002). "Idiopathic pulmonary fibrosis: an epithelial/fibroblastic cross-talk disorder." Respir Res **3**: 3.
- Selman, M., V. J. Thannickal, et al. (2004). "Idiopathic pulmonary fibrosis: pathogenesis and therapeutic approaches." Drugs **64**(4): 405-30.
- Shan, H., Y. Zhang, et al. (2009). "Downregulation of miR-133 and miR-590 contributes to nicotine-induced atrial remodelling in canines." Cardiovasc Res **83**(3): 465-72.
- Sheehan, J. P. and T. M. Phan (2001). "Phosphorothioate oligonucleotides inhibit the intrinsic tenase complex by an allosteric mechanism." Biochemistry **40**(16): 4980-9.
- Shigehara, K., S. Yokomuro, et al. (2011). "Real-time PCR-based analysis of the human bile microRNAome identifies miR-9 as a potential diagnostic biomarker for biliary tract cancer." PLoS One **6**(8): e23584.
- Shin, C., J. W. Nam, et al. (2010). "Expanding the microRNA targeting code: functional sites with centered pairing." Mol Cell **38**(6): 789-802.
- Shivshankar, P., C. Brampton, et al. (2012). "Caveolin-1 deficiency protects from pulmonary fibrosis by modulating epithelial cell senescence in mice." Am J Respir Cell Mol Biol **47**(1): 28-36.
- Simons, M. and G. Raposo (2009). "Exosomes--vesicular carriers for intercellular communication." Curr Opin Cell Biol **21**(4): 575-81.
- Siolas, D., C. Lerner, et al. (2005). "Synthetic shRNAs as potent RNAi triggers." Nat Biotechnol **23**(2): 227-31.

- Small, E. M., R. J. Frost, et al. (2010). "MicroRNAs add a new dimension to cardiovascular disease." Circulation **121**(8): 1022-32.
- Smart, E. J., Y. Ying, et al. (1996). "A role for caveolin in transport of cholesterol from endoplasmic reticulum to plasma membrane." J Biol Chem **271**(46): 29427-35.
- Son, J. Y., S. Y. Kim, et al. (2013). "TGF-beta1 T869C polymorphism may affect susceptibility to idiopathic pulmonary fibrosis and disease severity." Lung **191**(2): 199-205.
- Song, G., H. Zeng, et al. (2010). "miR-199a regulates the tumor suppressor mitogen-activated protein kinase kinase kinase 11 in gastric cancer." Biol Pharm Bull **33**(11): 1822-7.
- Sood, P., A. Krek, et al. (2006). "Cell-type-specific signatures of microRNAs on target mRNA expression." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(8): 2746-51.
- Stark, A., J. Brennecke, et al. (2005). "Animal MicroRNAs confer robustness to gene expression and have a significant impact on 3'UTR evolution." Cell **123**(6): 1133-46.
- Steele, M. P. and K. K. Brown (2007). "Genetic predisposition to respiratory diseases: infiltrative lung diseases." Respiration **74**(6): 601-8.
- Steele, M. P., M. C. Speer, et al. (2005). "Clinical and pathologic features of familial interstitial pneumonia." Am J Respir Crit Care Med **172**(9): 1146-52.
- Steinman, L. (2007). "A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage." Nat Med **13**(2): 139-45.
- Strieter, R. M. (2002). "Con: Inflammatory mechanisms are not a minor component of the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis." Am J Respir Crit Care Med **165**(9): 1206-7; discussion 1207-8.
- Strieter, R. M., B. N. Gomperts, et al. (2007). "The role of CXC chemokines in pulmonary fibrosis." J Clin Invest **117**(3): 549-56.
- Strutz, F. M. (2009). "EMT and proteinuria as progression factors." Kidney Int **75**(5): 475-81.
- Sturm, M., M. Hackenberg, et al. (2010). "TargetSpy: a supervised machine learning approach for microRNA target prediction." BMC Bioinformatics **11**: 292.
- Sun, L., M. C. Louie, et al. (2011). "New concepts of IL-10-induced lung fibrosis: fibrocyte recruitment and M2 activation in a CCL2/CCR2 axis." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **300**(3): L341-53.
- Sun, Q., Y. Zhang, et al. (2008). "Transforming growth factor-beta-regulated miR-24 promotes skeletal muscle differentiation." Nucleic Acids Res **36**(8): 2690-9.
- Tang, Y. W., J. E. Johnson, et al. (2003). "Herpesvirus DNA is consistently detected in lungs of patients with idiopathic pulmonary fibrosis." J Clin Microbiol **41**(6): 2633-40.
- Taniguchi, H., M. Ebina, et al. (2010). "Pirfenidone in idiopathic pulmonary fibrosis." Eur Respir J **35**(4): 821-9.
- Taskar, V. S. and D. B. Coultas (2006). "Is idiopathic pulmonary fibrosis an environmental disease?" Proc Am Thorac Soc **3**(4): 293-8.
- Tay, Y., J. Zhang, et al. (2008). "MicroRNAs to Nanog, Oct4 and Sox2 coding regions modulate embryonic stem cell differentiation." Nature **455**(7216): 1124-8.
- Tcherakian, C., V. Cottin, et al. (2011). "Progression of idiopathic pulmonary fibrosis: lessons from asymmetrical disease." Thorax **66**(3): 226-31.
- Thum, T., C. Gross, et al. (2008). "MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts." Nature **456**(7224): 980-4.
- Tobin, R. W., C. E. Pope, 2nd, et al. (1998). "Increased prevalence of gastroesophageal reflux in patients with idiopathic pulmonary fibrosis." Am J Respir Crit Care Med **158**(6): 1804-8.
- Tourkina, E., M. Richard, et al. (2010). "Caveolin-1 regulates leucocyte behaviour in fibrotic lung disease." Ann Rheum Dis **69**(6): 1220-6.
- Trabucchi, M., P. Briata, et al. (2009). "The RNA-binding protein KSRP promotes the biogenesis of a subset of microRNAs." Nature **459**(7249): 1010-4.
- Travis, W. D., U. Costabel, et al. (2013). "An official American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: Update of the international multidisciplinary classification of the idiopathic interstitial pneumonias." Am J Respir Crit Care Med **188**(6): 733-48.

- Trujillo, G., E. C. O'Connor, et al. (2008). "A novel mechanism for CCR4 in the regulation of macrophage activation in bleomycin-induced pulmonary fibrosis." *Am J Pathol* **172**(5): 1209-21.
- Tsang, A. R., H. D. Wyatt, et al. (2012). "hTERT mutations associated with idiopathic pulmonary fibrosis affect telomerase activity, telomere length, and cell growth by distinct mechanisms." *Aging Cell* **11**(3): 482-90.
- Tsang, J., J. Zhu, et al. (2007). "MicroRNA-mediated feedback and feedforward loops are recurrent network motifs in mammals." *Mol Cell* **26**(5): 753-67.
- Tsukigi, M., V. Bilim, et al. (2012). "Re-expression of miR-199a suppresses renal cancer cell proliferation and survival by targeting GSK-3 β ." *Cancer Lett* **315**(2): 189-97.
- Tzouvelekis, A., V. Harokopos, et al. (2007). "Comparative expression profiling in pulmonary fibrosis suggests a role of hypoxia-inducible factor-1 α in disease pathogenesis." *Am J Respir Crit Care Med* **176**(11): 1108-19.
- Tzur, G., A. Israel, et al. (2009). "Comprehensive gene and microRNA expression profiling reveals a role for microRNAs in human liver development." *PLoS One* **4**(10): e7511.
- Ueda, T., S. Volinia, et al. (2010). "Relation between microRNA expression and progression and prognosis of gastric cancer: a microRNA expression analysis." *Lancet Oncol* **11**(2): 136-46.
- Vaccaro, C. A., J. S. Brody, et al. (1985). "Alveolar wall basement membranes in bleomycin-induced pulmonary fibrosis." *Am Rev Respir Dis* **132**(4): 905-12.
- van Balkom, B. W., O. G. de Jong, et al. (2013). "Endothelial cells require miR-214 to secrete exosomes that suppress senescence and induce angiogenesis in human and mouse endothelial cells." *Blood* **121**(19): 3997-4006, S1-15.
- van der Krol, A. R., L. A. Mur, et al. (1990). "Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression." *Plant Cell* **2**(4): 291-9.
- van Mil, A., S. Grundmann, et al. (2012). "MicroRNA-214 inhibits angiogenesis by targeting Quaking and reducing angiogenic growth factor release." *Cardiovasc Res* **93**(4): 655-65.
- van Rooij, E., A. L. Purcell, et al. (2012). "Developing microRNA therapeutics." *Circ Res* **110**(3): 496-507.
- van Rooij, E., L. B. Sutherland, et al. (2007). "Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA." *Science* **316**(5824): 575-9.
- van Rooij, E., L. B. Sutherland, et al. (2008). "Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(35): 13027-32.
- Vannella, K. M., T. R. Luckhardt, et al. (2010). "Latent herpesvirus infection augments experimental pulmonary fibrosis." *Am J Respir Crit Care Med* **181**(5): 465-77.
- Vaucheret, H., C. Beclin, et al. (2001). "Post-transcriptional gene silencing in plants." *J Cell Sci* **114**(Pt 17): 3083-91.
- Verrecchia, F. and A. Mauviel (2002). "Transforming growth factor-beta signaling through the Smad pathway: role in extracellular matrix gene expression and regulation." *J Invest Dermatol* **118**(2): 211-5.
- Verrecchia, F. and A. Mauviel (2007). "Transforming growth factor-beta and fibrosis." *World J Gastroenterol* **13**(22): 3056-62.
- Volinia, S., G. A. Calin, et al. (2006). "A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(7): 2257-61.
- Vuorinen, K., F. Gao, et al. (2007). "Imatinib mesylate inhibits fibrogenesis in asbestos-induced interstitial pneumonia." *Exp Lung Res* **33**(7): 357-73.
- Wakiyama, M., K. Takimoto, et al. (2007). "Let-7 microRNA-mediated mRNA deadenylation and translational repression in a mammalian cell-free system." *Genes Dev* **21**(15): 1857-62.
- Walter, N., H. R. Collard, et al. (2006). "Current perspectives on the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis." *Proc Am Thorac Soc* **3**(4): 330-8.
- Wang, F., Z. Zheng, et al. (2010). "Correlation and quantitation of microRNA aberrant expression in tissues and sera from patients with breast tumor." *Gynecol Oncol* **119**(3): 586-93.
- Wang, G., B. C. Kwan, et al. (2012). "Urinary miR-21, miR-29, and miR-93: novel biomarkers of fibrosis." *Am J Nephrol* **36**(5): 412-8.

- Wang, J., W. Huang, et al. (2012). "MicroRNA-24 regulates cardiac fibrosis after myocardial infarction." *J Cell Mol Med* **16**(9): 2150-60.
- Wang, X. M., Y. Zhang, et al. (2006). "Caveolin-1: a critical regulator of lung fibrosis in idiopathic pulmonary fibrosis." *J Exp Med* **203**(13): 2895-906.
- Watanabe, S., Y. Ueda, et al. (2009). "HMGA2 maintains oncogenic RAS-induced epithelial-mesenchymal transition in human pancreatic cancer cells." *Am J Pathol* **174**(3): 854-68.
- Watanabe, T., T. Sato, et al. (2008). "Dnm3os, a non-coding RNA, is required for normal growth and skeletal development in mice." *Dev Dyn* **237**(12): 3738-48.
- Wells, A. U. (2013). "The revised ATS/ERS/JRS/ALAT diagnostic criteria for idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) - practical implications." *Respir Res* **14** Suppl 1: S2.
- Wick, G., A. Backovic, et al. (2010). "The immunology of fibrosis: innate and adaptive responses." *Trends Immunol* **31**(3): 110-9.
- Wightman, B., I. Ha, et al. (1993). "Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in *C. elegans*." *Cell* **75**(5): 855-62.
- Willis, B. C., J. M. Liebler, et al. (2005). "Induction of epithelial-mesenchymal transition in alveolar epithelial cells by transforming growth factor-beta1: potential role in idiopathic pulmonary fibrosis." *Am J Pathol* **166**(5): 1321-32.
- Wilson, M. S. and T. A. Wynn (2009). "Pulmonary fibrosis: pathogenesis, etiology and regulation." *Mucosal Immunol* **2**(2): 103-21.
- Winbanks, C. E., B. Wang, et al. (2011). "TGF-beta regulates miR-206 and miR-29 to control myogenic differentiation through regulation of HDAC4." *J Biol Chem* **286**(16): 13805-14.
- Worley, L. A., M. D. Long, et al. (2008). "Micro-RNAs associated with metastasis in uveal melanoma identified by multiplexed microarray profiling." *Melanoma Res* **18**(3): 184-90.
- Wu, F., N. J. Guo, et al. (2011). "Peripheral blood microRNAs distinguish active ulcerative colitis and Crohn's disease." *Inflamm Bowel Dis* **17**(1): 241-50.
- Wynn, T. A. (2004). "Fibrotic disease and the T(H)1/T(H)2 paradigm." *Nat Rev Immunol* **4**(8): 583-94.
- Wynn, T. A. (2007). "Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases." *J Clin Invest* **117**(3): 524-9.
- Wynn, T. A. (2011). "Integrating mechanisms of pulmonary fibrosis." *J Exp Med* **208**(7): 1339-50.
- Xiao, J., X. M. Meng, et al. (2012). "miR-29 inhibits bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice." *Mol Ther* **20**(6): 1251-60.
- Xu, P., J. Liu, et al. (2012). "Post-translational regulation of TGF-beta receptor and Smad signaling." *FEBS Lett* **586**(14): 1871-84.
- Yamashita, T., T. Hige, et al. (2005). "Vesicle endocytosis requires dynamin-dependent GTP hydrolysis at a fast CNS synapse." *Science* **307**(5706): 124-7.
- Yamauchi, M. and M. Shiiba (2008). "Lysine hydroxylation and cross-linking of collagen." *Methods Mol Biol* **446**: 95-108.
- Yang, H., W. Kong, et al. (2008). "MicroRNA expression profiling in human ovarian cancer: miR-214 induces cell survival and cisplatin resistance by targeting PTEN." *Cancer Res* **68**(2): 425-33.
- Yang, J. S. and E. C. Lai (2011). "Alternative miRNA biogenesis pathways and the interpretation of core miRNA pathway mutants." *Mol Cell* **43**(6): 892-903.
- Yang, J. S., T. Maurin, et al. (2010). "Conserved vertebrate mir-451 provides a platform for Dicer-independent, Ago2-mediated microRNA biogenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(34): 15163-8.
- Yang, M. H., M. Z. Wu, et al. (2008). "Direct regulation of TWIST by HIF-1alpha promotes metastasis." *Nat Cell Biol* **10**(3): 295-305.
- Yekta, S., I. H. Shih, et al. (2004). "MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA." *Science* **304**(5670): 594-6.
- Yin, G., R. Chen, et al. (2010). "TWISTing stemness, inflammation and proliferation of epithelial ovarian cancer cells through MIR199A2/214." *Oncogene* **29**(24): 3545-53.
- Yoo, A. S. and I. Greenwald (2005). "LIN-12/Notch activation leads to microRNA-mediated down-regulation of Vav in *C. elegans*." *Science* **310**(5752): 1330-3.
- Yu, B., L. Bi, et al. (2008). "The FHA domain proteins DAWDLE in *Arabidopsis* and SNIP1 in humans act in small RNA biogenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(29): 10073-8.

- Zafarullah, M., W. Q. Li, et al. (2003). "Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions." Cell Mol Life Sci **60**(1): 6-20.
- Zamore, P. D. and B. Haley (2005). "Ribo-gnome: the big world of small RNAs." Science **309**(5740): 1519-24.
- Zhang, J., D. J. Xu, et al. (2012). "HLA-A and HLA-B gene polymorphism and idiopathic pulmonary fibrosis in a Han Chinese population." Respir Med **106**(10): 1456-62.
- Zhang, K., M. D. Rekhter, et al. (1994). "Myofibroblasts and their role in lung collagen gene expression during pulmonary fibrosis. A combined immunohistochemical and in situ hybridization study." Am J Pathol **145**(1): 114-25.
- Zhang, Y., K. J. Fan, et al. (2012). "Functional screening for miRNAs targeting Smad4 identified miR-199a as a negative regulator of TGF-beta signalling pathway." Nucleic Acids Res **40**(18): 9286-97.
- Zhang, Y. E. (2009). "Non-Smad pathways in TGF-beta signaling." Cell Res **19**(1): 128-39.
- Zhang, Z., Z. Gao, et al. (2013). "3,3'-Diindolylmethane ameliorates experimental hepatic fibrosis via inhibiting miR-21 expression." Br J Pharmacol **170**(3): 649-60.
- Zhao, M., B. Song, et al. (2003). "Direct visualization of a stratified epithelium reveals that wounds heal by unified sliding of cell sheets." FASEB J **17**(3): 397-406.
- Zhao, Y. and D. Srivastava (2007). "A developmental view of microRNA function." Trends Biochem Sci **32**(4): 189-97.
- Zhong, H., H. R. Wang, et al. (2010). "Targeting Smad4 links microRNA-146a to the TGF-beta pathway during retinoid acid induction in acute promyelocytic leukemia cell line." Int J Hematol **92**(1): 129-35.
- Zhong, X., A. C. Chung, et al. (2011). "Smad3-mediated upregulation of miR-21 promotes renal fibrosis." J Am Soc Nephrol **22**(9): 1668-81.
- Zhu, Z., R. J. Homer, et al. (1999). "Pulmonary expression of interleukin-13 causes inflammation, mucus hypersecretion, subepithelial fibrosis, physiologic abnormalities, and eotaxin production." J Clin Invest **103**(6): 779-88.
- Zuo, F., N. Kaminski, et al. (2002). "Gene expression analysis reveals matrilysin as a key regulator of pulmonary fibrosis in mice and humans." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(9): 6292-7.